

**Strukturelle und biophysikalische Charakterisierung
des Cannulae-bildenden Proteins
von *Pyrodictium abyssi***



DISSERTATION ZUR ERLANGUNG DES
DOKTORGRADES DER NATURWISSENSCHAFTEN (DR. RER. NAT.)
DER FAKULTÄT FÜR BIOLOGIE UND VORKLINISCHE MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG

vorgelegt von
Raphael Reinhold Kreitner, geb. Schilp

aus München

im Jahr
2014

Das Promotionsgesuch wurde eingereicht am: 18.02.2014

Das Promotionskolloquium fand statt am: 09.05.2014

Die Arbeit wurde angeleitet von: Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer

Prüfungsausschuss:	Vorsitzender:	Prof. Dr. Joachim Ruther
	1. Gutachter:	Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer
	2. Gutachter:	Prof. Dr. Claudia Elisabeth Munte
	3. Prüfer:	Prof. Dr. Reinhard Sterner

Unterschrift:

A handwritten signature in blue ink, appearing to read 'Reinhard Sterner', is written below the 'Unterschrift:' label.

*In liebevoller Erinnerung
an meinen 2013 verstorbenen Vater*

Dr.-Ing. Reinhold Schilp

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	TAG11 des Archaeums <i>Pyrodictium abyssi</i>	2
1.2	Das extrazelluläre Netzwerk von <i>Pyrodictium</i>	3
1.3	Das Protein CanA und seine physiologischen Eigenschaften	5
1.4	Proteinstruktur	7
1.5	Strukturaufklärung von Proteinen mittels NMR-Spektroskopie	7
1.6	Zielsetzung	9
2	Materialien und Geräte	10
2.1	Chemikalien.....	10
2.2	Häufig verwendete Puffer-Lösungen	10
2.3	Plasmide und Bakterienstämme	11
2.3.1	Plasmide.....	11
2.3.2	Bakterienstämme.....	11
2.4	Kulturmedien und Antibiotika	11
2.4.1	Kulturmedien	11
2.4.2	Antibiotika	13
2.5	Enzyme	13
2.6	Protein Standards.....	13
2.7	SDS-Gele	14
2.8	Verbrauchsmaterialien und Zubehör	15
2.9	Geräte	15
2.9.1	Laborgeräte	15
2.9.2	Messgeräte.....	16
2.10	Chromatographiesäulen	17

2.11	Software	17
3	Methoden	18
3.1	Molekularbiologische Methoden	18
3.1.1	Chromatographie.....	18
3.1.1.1	Größenausschlusschromatographie.....	18
3.1.1.2	Ionenaustauschchromatographie	19
3.1.2	SDS-Page nach Laemmli	19
3.1.3	Western Blot.....	20
3.1.4	Konzentrationsbestimmung von Proteinen	21
3.1.4.1	Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford.....	21
3.1.4.2	Konzentrationsbestimmung von Proteinen über UV	22
3.1.5	Proteinkonzentrierung	23
3.1.6	Lyophilisieren von Proteinen	23
3.1.7	Polymerisierung und Trypsinverdau	24
3.1.8	Circular dichroismus-Spektroskopie	25
3.1.9	Dynamische Licht Streuung.....	27
3.1.10	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie.....	28
3.1.11	Transmissions-Elektronenmikroskopie	30
3.1.12	In-vivo Expression von CanA und seinen Konstrukten	32
3.1.13	Anzucht der unmarkierten Expressionskulturen	33
3.1.14	Anzucht ¹⁵ N-, ¹³ C- markierter Expressionskulturen mit Mediumwechsel und erhöhter Bakterienkonzentration	33
3.1.15	Anzucht ¹⁵ N-, ¹³ C- markierter Expressionskulturen im Vollminimalmedium	35
3.1.16	Reinigung von CanA und K ₁ -CanA.....	35
3.1.16.1	Zellaufschluss.....	35

3.1.16.2	Reinigung – Hitzeschritt.....	36
3.1.16.3	Reinigung – Ionenaustauschchromatographie	36
3.1.16.4	Reinigung - Größenausschlusschromatographie	37
3.2	NMR Spektroskopie.....	37
3.2.1	Probenvorbereitung	37
3.2.2	Verwendete NMR Pulsprogramme	38
3.2.2.1	1D Spektren	38
3.2.2.1.1	¹ H-Spektren.....	38
3.2.2.2	Diffusionsmessungen	39
3.2.2.3	2D Spektren	40
3.2.2.3.1	¹³ C-, ¹⁵ N- ¹ H-HSQC's	40
3.2.2.3.2	TOCSY	41
3.2.2.3.3	NOESY	42
3.2.2.3.4	Aromaten Experimente 2D (HB)CB(CGCC_TOCSY)Har und 2D (HB)CB(CGCD)HD	43
3.2.2.4	3D Spektren	45
3.2.2.4.1	¹⁵ N-NOESY-HSQC	45
3.2.2.4.2	HNCO	46
3.2.2.4.3	HNCA	48
3.2.2.4.4	CBCA(CO)NH.....	49
3.2.2.4.5	CBCANH	50
3.2.2.4.6	HCCH-TOCSY.....	52
3.2.2.4.7	HCAN	53
3.2.3	Diffusions- ¹ H-Spektroskopie.....	54
3.2.3.1	Probenvorbereitung für die Diffusionsmessungen	54
3.2.3.2	Durchführung der Diffusionsmessungen	55

3.2.3.3	Auswertung der Diffusionsmessungen	55
3.2.4	K ₁ -CanA und CanA Titrationsen mit Ca ²⁺ und Mg ²⁺ über (¹ H- ¹⁵ N)-sofast-HMQC-Spektroskopie	57
3.2.4.1	Probenvorbereitung für die Titrationsen	57
3.2.4.2	Durchführung der Titrationsmessungen	57
3.2.4.3	Bestimmung der Bindungsstellen im Protein	58
3.2.4.4	Bestimmung der Bindungskonstanten	59
3.2.5	Die cis- / trans- Konformation bei Prolinen	61
4	Ergebnisse	63
4.1	CanA und das Konstrukt K ₁ -CanA.....	63
4.2	Expression und Reinigung.....	64
4.2.1	Optimierungen der Expression und der Reinigung von CanA und seinen Konstrukten	64
4.3	Polymerisierung von CanA und K ₁ -CanA	69
4.4	Trypsinverdau von CanA und polymerisierten CanA.....	77
4.5	Expression, Reinigung und physikalische Eigenschaften der Konstrukte K ₁ -CanA und K ₂ -CanA.....	81
4.6	CD-Spektroskopie von K ₁ -CanA und CanA.....	83
4.7	Dynamische Lichtstreuung von CanA bei verschiedenen pH Werten.....	84
4.8	FT-IR Messungen von monomeren und polymerisierten CanA.....	87
4.9	TEM-Messungen von monomeren, polymerisierten CanA und K ₁ -CanA	88
4.10	Definierung des Aggregationszustandes von CanA in Lösung durch ¹ H-NMR-Diffusionsmessungen	92
4.11	Ca ²⁺ / Mg ²⁺ Titrationsen.....	95
4.11.1	(¹ H- ¹⁵ N)-sofast-HMQC-Titrationsen von K ₁ -CanA und CanA mit Ca ²⁺ / Mg ²⁺	95
4.11.1.1	Bestimmung der Bindungsstellen	95

4.11.1.2	Berechnung der Bindungskonstanten von CanA und K ₁ -CanA für Ca ²⁺ und Mg ²⁺	103
4.12	Die Eigenpolymerisation von CanA	112
4.13	Strukturbestimmung von K ₁ -CanA	118
4.13.1	Vergleich der ¹ H- ¹⁵ N-HSQC's von CanA und K ₁ -CanA	118
4.13.2	Mischexperimente von CanA mit K ₁ -CanA	120
4.13.3	Die sequentielle Zuordnung von K ₁ -CanA	125
4.13.4	Sekundärstrukturbestimmung von K ₁ -CanA	128
4.13.5	Die cis- / trans- Konformation der Proline von K ₁ -CanA	133
4.14	NMR Struktur von K ₁ -CanA	135
5	Diskussion	137
5.1	Expression und Reinigungsschritte von CanA und K ₁ -CanA	137
5.2	Zustands- und Sekundärstrukturbestimmungen von CanA, polymerisiertem CanA und K ₁ -CanA	139
5.3	Bindungsstellen von K ₁ -CanA bzw. CanA und die damit verbundenen Rückschlüsse auf die Struktur	146
5.4	Die Struktur von K ₁ -CanA	151
6	Zusammenfassung	152
7	Abkürzungsverzeichnis	155
8	Literaturverzeichnis	158
9	Anhang	169
10	Danksagung	190

1 Einleitung

Im Verlauf der Evolution ist es vielen Organismen gelungen, sich an die lebensunwirtlichsten Umweltbedingungen anzupassen und ihre eigene Lebensnische zu finden. An einer von vier Stellen des Mittelatlantischen Rückens, der sogenannten TAG-site (*Trans Atlantic Geotraverse*) bei 26 °N existieren hydrothermale Tiefseequellen, „*white, grey und black smoker*“ genannt. Diese entstehen durch das Eindringen von Meerwasser in Magma-Kammern, welche das Wasser auf 260 bis 405 °C aufheizen und mit Schwermetallsalzen und Gasen (H_2S , CO_2 , H_2 , NH_4 , CO) anreichern [1, 2, 3]. Das Fluid-Gasgemisch entweicht unter hohem Druck aus den Spalten am Meeresgrund wobei es schlagartig durch das 2 °C kalte Meerwasser abgekühlt wird. Durch diesen plötzlichen Temperatursturz kommt es zum Überschreiten des Löslichkeitsproduktes des übersättigten Fluids. Hierdurch werden Niederschläge aus Schwermetallsulfiden wie hauptsächlich Markasit (FeS_2), Pyrit (FeS_2), Chalkopyrit (CuFeS_2), Bornit (Cu_5FeS_4), Pyrrhotin (Fe_{1-x}S mit $x = 0$ bis 0.17; FeS bis $\text{Fe}_{10}\text{S}_{11}$) bei „*black smokers*“ und Sphalerit (ZnS), Sulfate [Anhydritspat (CaSO_4), Gipsapat ($\text{Ca}[\text{SO}_4] \cdot 2\text{H}_2\text{O}$)], Siliciumoxide (allgemeine Verhältnisformel SiO_2) bei „*grey und white smokers*“ ausgefällt [4,5,6].

Die porösen Wände sowie die Umgebung dieser im Mittel 20 bis 25 m hohen hydrothermalen Tiefseequellen-Schlote bilden ein eigenes Biotop mit vielen thermophilen Arten. Die Grundlage der Nahrungskette dieser Biotope bilden hierbei chemosynthetisch aktive, autotrophe Bakterien und Archaeen. Diese sind in der Lage, organische Verbindungen aus anorganischen Stoffen (wie z.B. Kohlenstoffdioxid als Kohlenstoffquelle) durch z.B. die Oxidation von Wasserstoff/Schwefel als alternative Energiequelle (anstatt durch die herkömmliche Photosynthese mit Licht) aufzubauen [7, 8]. Eine Art dieser hyperthermophilen, meist schwefelreduzierenden Archaea bildet die Gattung *Pyrodictium*, welche in der Lage ist, aus H_2 und S^0 H_2S zu produzieren und phylogenetisch wie in **Abbildung 1.1** beschrieben zugeordnet werden können [9].

Domäne: Archaea

Reich: Crenarchaeota

Stamm: Crenarchaeota

Klasse: Thermoprotei

Ordnung: Desulfurococcales

Familie: Pyrodictiaceae

Gattung: ***Pyrodictium***

Spezies: *P. abyssi*

P. occultum

P. Brockii

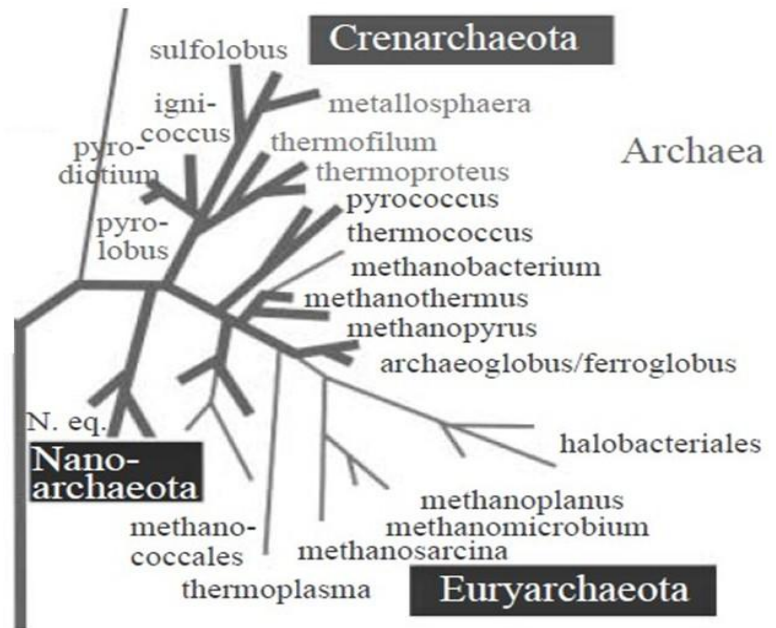


Abbildung 1.1: Phylogenetische Zuordnung von *Pyrodictium* und archaealer Stammbaum auf Basis von rDNA nach Karl O. Stetter – die Hyperthermophilen Organismen sind durch fettgedruckte Linien gekennzeichnet (aus Karl O. Stetter, „Hyperthermophiles in the history of life“, Phil. Trans. R. Soc. B (2006) 361, 1837–1843) [9]

1.1 TAG11 des Archaeums *Pyrodictium abyssi*

Aus jenem oben erwähnten Mittelatlantischen Rücken wurde in 3600 m Tiefe das Isolat TAG11 aus den Wänden eines „black smokers“ entnommen, welches der Gattung *Pyrodictium abyssi* zugeordnet werden konnte. Diese Spezies wächst im Gegensatz zum Typstamm AV2 bei einer optimalen Wachstumstemperatur von 100 °C autotroph. Sie ist als einziger Vertreter der Gattung *Pyrodictium* in der Lage sowohl Schwefel, Thiosulfat als auch Sulfid als Elektronenakzeptor mit Wasserstoff als Elektronendonator unter anaeroben Bedingungen bei leicht saurem pH für sich zu nutzen [10]. Der herkömmliche Typstamm AV2 von *Pyrodictium abyssi* und *Pyrodictium occultum* können hingegen nur Schwefel und Thiosulfat und *Pyrodictium Brockii* nur Schwefel und Sulfid für ihre Redoxreaktionen verwenden [22, 23, 24]. Die Zellen von TAG11 (sowie bei allen Vertretern von *Pyrodictium*) sind mit einem

Zellendurchmesser von 0.3 - 2.5 μm sehr dünn, unregelmäßig geformt und zeichnen sich durch stark abgeflachte Bereiche aus, was in einem hohen Oberflächen-Volumen-Verhältnis resultiert (**Abbildung 1.2**) [12, 24, 25].

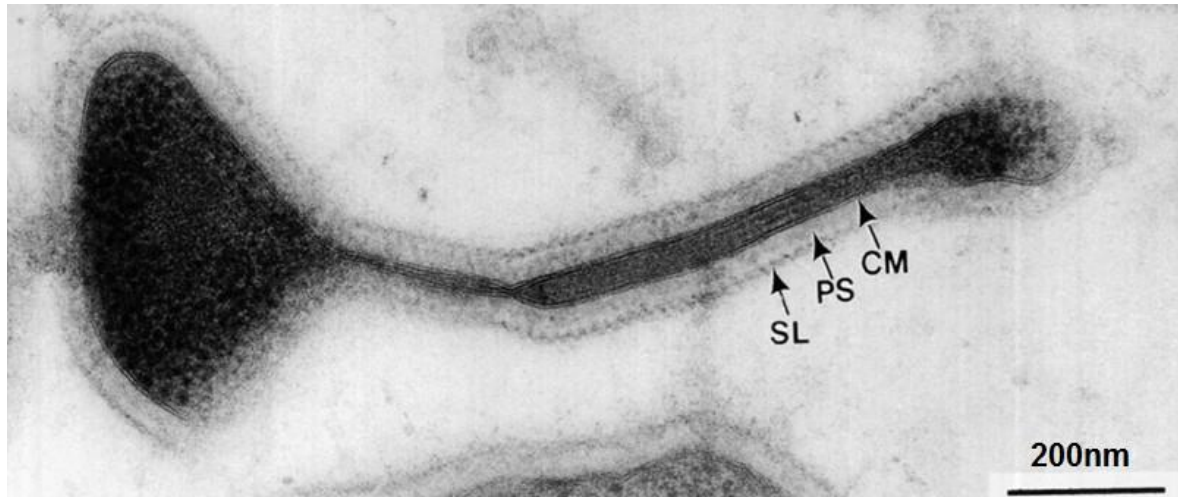


Abbildung 1.2: TEM - Querschnitt einer Zelle mit einem extrem abgeflachten Bereich; SL = S-Layer, PS = periplasmatischer Raum, CM = Cytoplasmamembran (G.Rieger, R.Rachel, R.Hermann, K.O.Stetter; Ultrastructure of the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrodicticum abyssi*; journal of structural biology 115, 78-87 (1995)) [12]

Die Zellen sind in ein extrazelluläres Netzwerk aus länglichen Proteinhohlröhren (so bezeichneten „Cannulae“, abgeleitet vom Lateinischen: canna – Rohr; Diminutivum: cannula - Röhrchen) eingebunden, was die Gattung *Pyrodicticum* unter den Prokaryonten einzigartig macht [27].

1.2 Das extrazelluläre Netzwerk von *Pyrodicticum*

Das spinnwebartige Netzwerk von *Pyrodicticum abyssi* TAG11 (**Abbildung 1.3**) besteht aus zwei verschiedenen Arten von Fortsätzen [12]. Zum einen aus den relativ dicken Cannulae mit einem Außendurchmesser von ca. 25 nm (Innendurchmesser von ca. 20 nm) und zum anderen aus 11 nm dicken Flagellen. Die in den periplasmatischen Raum (jedoch nicht ins Cytoplasma) der Zelle von Isolat TAG11 ein- und austretenden Cannulae verbinden somit mehrere Zellen über ihre periplasmatischen Räume miteinander [27]. Innerhalb des Netzwerkes treten

des Öffern „blinde Enden“ von nicht weiter gewachsenen/verknüpften Cannulae, knotenförmige Regionen, sich verzweigende und ganze Bündel aggregierter hohlförmiger Cannulae auf [12].

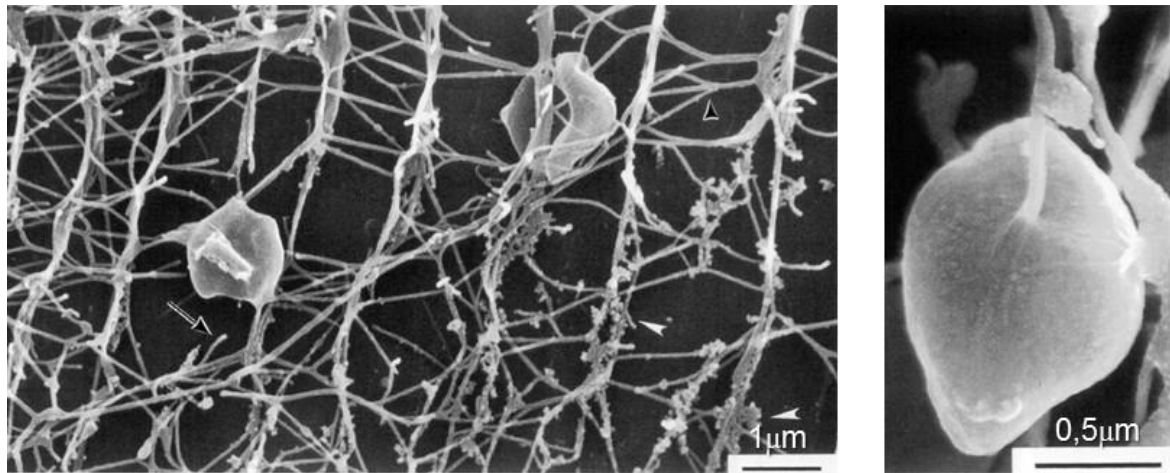


Abbildung 1.3: SEM - Ausschnitt des extrazellulären Netzwerks mit Cannulae und Zellen; blinde Enden wurden durch einen langen dunklen Pfeil, Aggregate von Cannulae mit einem dunklen Pfeilkopf und gequollene, knotenförmige Regionen mit einem weißen Pfeilkopf gekennzeichnet, Maßstab 1 µm; Verknüpfung eines Cannulae mit einer Zelle Maßstab 0.5 µm (G.Rieger, R.Rachel, R.Hermann, K.O.Stetter; Ultrastructure of the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrodicticum abyssi*; journal of structural biology 115, 78-87 (1995)) [12]

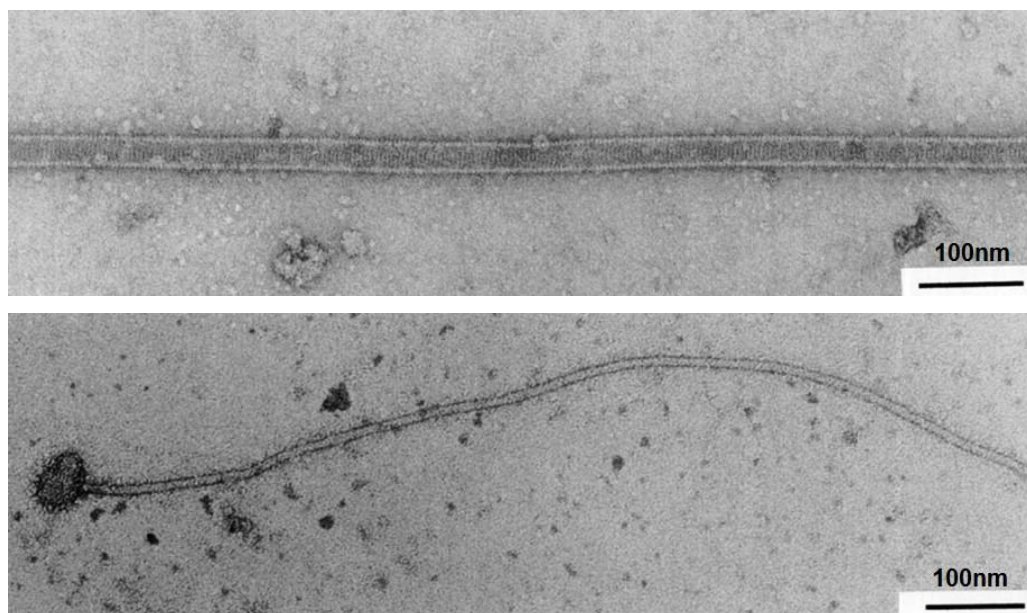


Abbildung 1.4: TEM – isolierte Cannulae und Flagelle angefärbt mit UAc (G.Rieger, R.Rachel, R.Hermann, K.O.Stetter; Ultrastructure of the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrodicticum abyssi*; journal of structural biology 115, 78-87 (1995)) [12]

Elektromikroskopische Untersuchungen der Cannulae zeigten eine Querstreifung mit einer Periodizität von $(4.4 \text{ nm})^{-1}$ bei einer helikalen Steigung von $7 - 8^\circ$ (**Abbildung 1.4**) [12].

Am zellnahen Ende können die Cannulae mit einer Geschwindigkeit von $1 - 1.5 \text{ } \mu\text{m}$ pro Minute bis zu einer Länge von $30 - 150 \text{ } \mu\text{m}$ wachsen [28]. Die nativen Cannulae sind extrem hitzestabil und widerstanden vereinzelt 140°C für bis zu 60 min und einer Inkubation mit 2% SDS-Lösung bei 100°C für 10 min unbeschadet ohne offensichtliche Strukturänderung [12].

Die genaue Funktion dieses extrazellulären Netzwerks ist weitgehend unbekannt. Es wird vermutet, dass die enorme Vergrößerung des periplasmatischen Raums durch das Netzwerk der Cannulae zur besseren/schnelleren Nährstoffabsorption oder zum interzellulären Transport zwischen den Zellen von Metaboliten, genetischem Material oder Zellbestandteilen dienen könnte [29]. Bisher wurden keine Mutanten der Gattung *Pyridictium* ohne extrazelluläres Netzwerk dokumentiert, was die Schlussfolgerung zulässt, dass das extrazelluläre Netzwerk ein essentieller Bestandteil von *Pyridictium* ist.

Die natürlichen Cannulae des Netzwerks sind in ihren Hauptbestandteilen aus drei helikal angeordneten Glykoprotein-Untereinheiten CanA, CanB und CanC aufgebaut. Zwei weitere gefundene Genfragmente CanD und CanE konnten jedoch nicht bei isolierten natürlichen Cannulae nachgewiesen werden. Das Fehlen eines Operons in den Cannulae-Genen ermöglicht es, jede der Untereinheiten individuell zu exprimieren [30, 43].

1.3 Das Protein CanA und seine physiologischen Eigenschaften

Dank der Arbeiten von B. Mai und G. Rieger konnten die Cannulae sowie die Proteine, aus welchen sie aufgebaut sind, schon weitgehend charakterisiert werden. Die Aminosäuresequenzen der Untereinheiten CanA, CanB und CanC sind sehr stark homolog aufgebaut (besonders im N-Terminus). CanA bildet hierbei mit ihren 182 Aminosäuren und 19.8 kDa die größte Untereinheit aus und besitzt keine

Leitsequenz. Allen Hauptsequenzen der drei Proteine ist eine 25 Aminosäuren lange Signalsequenz vorgeschaltet, welche den Transport in den Periplasmatischen Raum ermöglicht. Diese Signalsequenz besitzt einen hohen Anteil an hydrophoben Aminosäuren, welche das Durchdringen der Cytoplasmamembran mit ihren hydrophoben Seitenketten ermöglichen [43].

Wie sich bei den Arbeiten von B. Mai herausstellte, ist es bei CanA im Gegensatz zu seinen Homologen möglich, aus den rekombinanten Untereinheiten in vitro homooligomere Proteinröhren herzustellen, deren Untereinheiten hauptsächlich in einer zweisträngigen Helix angeordnet sind. Diese Cannulae besitzen ebenfalls wie die natürlichen Cannulae des extrazellulären Netzwerks eine Länge von bis zu 150 μm , einen Außendurchmesser von ca. 25 nm und eine Periodizität von $(4.4 \text{ nm})^{-1}$. Die Polymerisation des Proteins CanA wurde hierbei mittels zweiwertiger Metallkationen (am effizientesten bei Ca^{2+} und Mg^{2+}) bei leicht azidem pH (pH 6) und 37 °C induziert. Das Protein CanA weist an sich auch eine schleichende Eigenpolymerisation auf, welche jedoch in Abwesenheit zweiwertiger Kationen größten Teils zu unregelmäßigen Strukturen führt [43]. Die aus rekombinantem CanA Protein hergestellten Cannulae besitzen ebenso wie die natürlichen Cannulae eine sehr hohe Hitzestabilität (von bis zu 128 °C) und erwiesen sich bei Denaturierungsexperimenten als äußerst stabil. Doch nicht nur die rekombinanten Cannulae sondern auch das rekombinante Protein CanA selbst besitzt mit seiner Hitzestabilität von bis zu 100 °C erstaunliche intrinsische Eigenschaften [43]. Die industriellen Einsatzmöglichkeiten von hitzebeständigen, nicht denaturierenden Hohlfasernetzwerken, welche in-vitro hergestellt und spezifisch modifiziert werden können, sind nahezu grenzenlos. Das selbst polymerisierende Protein CanA aus *Pyrodictium abyssi* und dessen oligomere Cannulae könnten z.B. bei der Entwicklung biologischer, sich selbst polymerisierender Membranen, stereospezifisch durchlässiger Hohlfaserkanäle, als Stoff fixierende Nanoröhren oder organische Leiter eingesetzt werden. Für eine mögliche Modifikation solcher Cannulae-Netzwerke ist es allerdings von größter Bedeutung, das Polymerisationsverhalten, die Proteinstruktur sowie die Interaktionsstellen der einzelnen Proteinuntereinheiten genauestens zu kennen.

1.4 Proteinstruktur

(Bio-)Moleküle sind am stabilsten in einem möglichst energiearmen Zustand, welcher thermodynamischen Gesetzmäßigkeiten unterliegt. Hierdurch bilden die hydrophilen und hydrophoben Bestandteile von Proteinen in wässrigem Milieu einen hydrophoben Core aus, was im besten Fall einen komplexen, kompakt gepackten Faltungszustand des Proteins zur Folge hat. Hierbei zeigen die hydrophoben Seitenketten der Aminosäuren in den hydrophoben Core während die hydrophilen Seitenketten (mit Alkohol-, Thiol-, Amin-, Carbonsäure- und Carbamoyl-Gruppen) möglichst nach außen zeigen (ähnlich einer Mizelle). Stark hydrophile (meist kleinere) Peptide und Proteine mit wenig hydrophoben Seitenketten können keinen Core ausbilden und liegen meist nur teilweise oder ungefaltet vor. Jedoch bilden diese Proteine meist mit Hilfe eines Liganden oder eines anderen Proteins als Bindungspartner eine Struktur aus, was man als induzierte Faltung bezeichnet. Die in vitro notwendigen Umgebungsbedingungen für eine möglichst korrekte native Faltung eines Proteins stellen hierbei eine nicht zu verkennende Schwierigkeit dar.

1.5 Strukturaufklärung von Proteinen mittels NMR-Spektroskopie

Zur Strukturaufklärung von Proteinen im atomaren Bereich gibt es zum einen die Röntgenstrukturanalyse, welche starre, kristallisierte Proteine verwendet und die NMR-Spektroskopie (*Nuclear Magnetic Resonance*), welche unter möglichst physiologischen Bedingungen ein Protein in Lösung verwendet.

Hierbei können bei der NMR-Spektroskopie (im Gegensatz zur Röntgenstrukturanalyse) je nach Bedarf die Messbedingungen (wie z.B. Salzgehalt, pH Wert, Interaktionspartner, Temperatur und Druck) in einem bestimmten Rahmen variiert werden, wobei auch dynamische Prozesse des Proteins gemessen werden können. Hierdurch ergeben sich breit gefächerte Möglichkeiten, ein Protein aufgrund seiner enzymatischen Aktivität, seiner Interaktionspartner, aktiven Zentren und dessen Kinetik genau zu charakterisieren.

Damit ein Protein bzw. dessen zu messende Atome in der NMR „sichtbar“ werden, müssen die Atomkerne eine ungerade Kernzahl (z.B. ^1H , ^{13}C , ^{15}N etc.) und somit einen Eigendrehimpuls (Kernspin) besitzen. Durch diesen Kernspin kann beim Anlegen eines externen magnetischen Feldes ein magnetischer Moment, der mehrere Energiezustände aufweist, entstehen. Die Stärke des angelegten Feldes beeinflusst hierbei die Energiedifferenz dieser Zustände proportional. Die Anhebung eines Protons in den nächst höheren Energiezustand erfolgt durch das Einstrahlen eines an die Energiedifferenz angepassten elektromagnetischen Impulses mit entsprechender Frequenz. Jeder magnetische Kern mit Elektronenwolke besitzt ein eigenes lokales Magnetfeld, welches von der elektromagnetischen Umgebungen der Nachbarkerne (chemische Verschiebung) abgeschirmt oder verstärkt wird. Hieraus ergeben sich für jedes einzelne Atom spezifische chemische Verschiebungen, welche zur Strukturberechnung herangezogen werden können.

Neben der Feldstärke des Spektrometers ist vor allem die Proteingröße bzw. dessen Aggregationszustand von enormer Bedeutung für die Auflösung der NMR-Spektren. Je größer ein Protein bzw. dessen Aggregat, desto größer ist die Verbreiterung der einzelnen Signale aufgrund der verkürzten transversalen Relaxationszeit T_2 , welche durch die langsamere Korrelationszeit herrührt. Hinzu kommt noch, dass durch die Zunahme der Proteingröße sich die Signale der Atome mit ähnlicher chemischer Umgebung überlagern können.

Erfolgt eine Aggregation in gleicher Konformation vorliegenden Monomeren mit nur einem Oligomerisierungszustand, erhält man NMR-Signale, die einem einzelnen Monomer entsprechen würden, mit einer Linienverbreiterung entsprechend der Masse des Oligomers. Durch die schnelle Eigenpolymerisation von CanA zu größeren Aggregaten, insbesondere in Anwesenheit von 2 wertigen Kationen, wurde diesbezüglich besonders darauf geachtet, diese Aggregation zu vermeiden.

Die Strukturbestimmung bei kleineren Proteinen ($M \leq 15 \text{ kDa}$) erfolgt in der NMR in der Regel anhand zweidimensionaler homonuklearer Protonenspektren (2D NOESY, TOCSY, COSY) wohingegen Strukturbestimmungen größerer Proteine (wie CanA mit $M = 21 \text{ kDa}$) zusätzlich durch heteronukleare Experimente (wie z.B. HNCA, HNCO, $\text{C}_\beta\text{C}_\alpha(\text{CO})\text{NH}$, $\text{C}_\beta\text{C}_\alpha\text{NH}$, $^{13}\text{C}\text{-HCCH-TOCSY}$, HCN, $^{15}\text{N-} / ^{13}\text{C}\text{-HSQC}$) ergänzt werden

müssen. Diesbezüglich benötigt man ^{15}N und ^{13}C isotopenmarkierte Proteine, die in vitro oder in vivo hergestellt werden können.

Eine weitere Möglichkeit bei zunehmender Proteingröße ist die zusätzliche Perdeuterierung der Proteine durch die Expression in auf D_2O anstatt Wasser basierenden Medien. Dabei kommt es zu einer Verminderung der Protonendichte, wodurch sich wiederum die Relaxation vermindert [31].

1.6 Zielsetzung

Ziel dieser Arbeit ist die ausführliche Charakterisierung und Strukturaufklärung des Proteins CanA und seiner Cannulae. Hierfür werden zuerst die bestehenden Expressionsprotokolle von B. Mai und K. Singer für das Protein CanA erweitert und an die für die NMR-Spektroskopie benötigten Modifikationen (Isotopenmarkierung) angepasst. Des Weiteren werden diverse biophysikalische Methoden durchgeführt, welche zusätzliche Aussagen über die Eigenschaften und Sekundärstruktur von CanA und seinen rekombinanten Cannulae liefern sollen. Die letztendliche Strukturaufklärung des Proteins CanA erfolgt unter möglichst nativen Bedingungen über die NMR-Spektroskopie. Die für die Langzeit-NMR-Spektroskopie hinderlichen Polymerisierungseigenschaften von CanA sollten durch die Herstellung eines nicht polymerisierenden Konstrukts des Proteins CanA (welches dennoch eine möglichst identische Struktur aufweisen sollte) umgangen werden.

2 Materialien und Geräte

2.1 Chemikalien

Die Grundausstattung an verwendeten Chemikalien und Reagenzien wurden in der möglichst höchsten Reinheitsstufe (Analysequalität) von den Firmen Amersham Life Science (Little Chalfont, England), Euriso-Top (Saarbrücken, Deutschland), Gerbu Biotechnik (Gaiberg, Deutschland), Merck (Darmstadt, Deutschland), MP Biomedicals (Illkirch, Frankreich), Roche Diagnostics (Mannheim, Deutschland), Roth (Karlsruhe, Deutschland), Serva (Heidelberg, Deutschland), Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland) und VWR (Ismaning, Deutschland) bezogen.

2.2 Häufig verwendete Puffer-Lösungen

Aufschlusspuffer: 50 mM TRIS/HCl pH = 7.4; 50 mM NaCl, 5 mM EDTA

Chromatographiepuffer I: 50 mM TRIS/HCl pH = 7.4

Chromatographiepuffer II: 50 mM TRIS/HCl pH = 7.4; 500 mM NaCl

Gelfiltrationspuffer: 50 mM TRIS/HCl pH = 7.4; 50 mM NaCl,

NMR-Puffer: 50 mM TRIS/HCl pH = 6.6 / 7.5; 50 mM NaCl; 0.4 mM DSS; (0.2 – 0.4 mM NaN₃); 10% D₂O

20 mM Na₂HPO₄/NaH₂PO₄ pH = 6.6 / 7.5; 0.4 mM DSS; (0.2 – 0.4 mM NaN₃); 10% D₂O

Polymerisierungspuffer: 50 mM TRIS/HCl pH = 6.5; 80 mM NaCl; (0.4 mM DSS); (0.4 mM NaN₃)

<u>Liophylisierpuffer:</u>	50 mM NaHCO ₃ ; pH = 7; bzw. H ₂ O; pH = 7
<u>Western-Blot-Puffer:</u>	25 mM TRIS, 192 mM Glycin, 20% Methanol; pH = 8.3

2.3 Plasmide und Bakterienstämme

2.3.1 Plasmide

<u>pET17b-CanA:</u>	Amp ^r , T7, Flag-Tag (Bianca Mai, Regensburg)
----------------------------	--

2.3.2 Bakterienstämme

<u>E. coli BL21(DE3) pLysS:</u>	F^- <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r_B^- m_B^-) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3) [pLysS Cam ^r]
<u>E. coli BL21(DE3):</u>	F^- <i>ompT</i> <i>hsdS_B</i> (r_B^- m_B^-) <i>gal</i> <i>dcm</i> (DE3), Novagen Madison (USA)

2.4 Kulturmedien und Antibiotika

2.4.1 Kulturmedien

Die Angaben beziehen sich auf 1 L des jeweiligen Mediums

<u>LB₀(Lysogeny Broth)-Medium:</u>	10 g Bacto Trypton; 5 g Bacto Yeast, 10 g NaCl; 0.2 g NaOH; Auffüllen auf 1 L mit H ₂ O (Millipore); Zugabe des passenden Antibiotikums (siehe Antibiotika); autoklavieren
--	--

Neidhardt Minimalmedium: 100 mL SE-1; 1 mL SE-2; 1 mL Thiamin/HCl (1 M); 80 mL MOPS/KOH (1 M; pH = 7.4); 2 g Glucose (bzw. ^{13}C -Glucose); 1 g NH_4Cl (bzw. $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$); pH mit HCl/KOH auf 7.4 einstellen; Zugabe des passenden Antibiotikums (siehe Antibiotika); Auffüllen auf 1 L mit H_2O (Millipore) und steril filtrieren

SE-1(Spurenelementemix): 0.24 g K_2SO_4 ; 14.60 g NaCl; 0.90 g KH_2PO_4 ; (haltbar bei 4 °C) 0.54 g $\text{MgCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$; Auffüllen auf 0.5 L mit H_2O (Millipore) und steril filtrieren

SE-2 (Spurenelementemix): 0.96 g Tritriplex I; 0.28 g $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; (haltbar bei 4 °C) 100 μL CaCl_2 (0.5 M); 100 μL H_3BO_3 (0.4 M); 100 μL $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{27} \times 4 \text{H}_2\text{O}$ (43 mM); 100 μL $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$ (30 mM); 100 μL $\text{CuSO}_4 \times 5 \text{H}_2\text{O}$ (10 mM); 100 μL $\text{MnCl}_2 \times 4\text{H}_2\text{O}$ (80 mM); 100 μL $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$ (10mM); Auffüllen auf 100 mL mit H_2O (Millipore) und steril filtrieren

Neues Minimal Medium (NMM): 7.50 g NaHPO_4 ; 3 g KH_2PO_4 ; 0.50 g NaCl 0.25 g $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{H}_2\text{O}$; 14 mg $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{H}_2\text{O}$ 10 mL SEM-mix; 2 g Glucose (bzw. ^{13}C -Glucose) 1 g NH_4Cl (bzw. $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$); 1 mg Thiamin/HCl; pH mit HCl/NaOH auf 7.4 einstellen; Zugabe des passenden Antibiotikums (siehe Antibiotika); Auffüllen auf 1 L mit H_2O (Millipore) und steril filtrieren

SEM (Spurenelementemix): 1 mL SE-3; 0.9 mL SE-4; Auffüllen auf 10 mL mit H_2O (Millipore) und steril filtrieren

SE-3 (Spurenelemente): 100 mg $\text{ZnSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 30 mg MnCl_2 ; (haltbar bei 4 °C); 300 mg HBO_3 ; 200 mg $\text{CoCl}_2 \times 6 \text{ H}_2\text{O}$; 10 mg $\text{CuCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 20 mg $\text{NiCl} \times 6 \text{ H}_2\text{O}$; 30 mg Na_2MoO_4 ; Auffüllen auf 1 L mit H_2O (Millipore) und steril filtrieren

SE-4 (EDTA- FeSO_4): 500 mg EDTA; 200 mg $\text{FeSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$ (immer frisch ansetzen) Auffüllen auf 1 L mit H_2O (Millipore) und steril Filtrieren

2.4.2 Antibiotika

Die Antibiotika stammen jeweils von der Firma GERBU Biotechnik GmbH (Gaiberg).

Carbenicillin (Carb): Stammlösung: 50 mg/mL in H_2O (Millipore); steril filtriert;

Chloramphenicol (Cam): Stammlösung: 34 mg/mL in H_2O (Millipore); steril filtriert;

2.5 Enzyme

Trypsin: porcine pancreas Type II, lyophilized powder; Sigma-Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)

2.6 Protein Standards

Dalton Mark VII – L: Sigma - Aldrich (Deisenhofen, Deutschland)
L7 (66/45/36/29/24/20.1/14.2 kDa)

PageRuler™ Fermentas (St.LeonRot,Deutschland)

Unstained Protein Ladder: PR (200/150/120/100/85/70/60/50/40/30/25/20/15/10 kDa)

2.7 SDS-Gele

Lösungen:

Lösung A: Rotiphorese® Gel 30 (37.5:1; 30% (w/v) Acrylamid, 0.8% (w/v) Bisacrylamid; Roth) (lichtgeschützte Lagerung)

Lösung B: 1.5 M TRIS/HCl, pH 8.8

Lösung C: 0.5 M TRIS/HCl, pH 6.8

20% (w/v) SDS (Natriumdodecylsulfat)

10% (w/v) APS (Ammoniumpersulfat, Lagerung kurz 4 °C,)

TEMED (Lagerung 4 °C; Roth)

Laufpuffer: 25 mM TRIS, 200 mM Glycin, 0.1% SDS

SDS-Probenpuffer: 230 mM TRIS pH 6.8, 6.85% SDS, 24% Glycerin, 0.4 M DTE, 0.008% Bromphenolblau 5% (v/v), β -Mercaptoethanol, 0.008% (w/v)

Trenngelzusammensetzung 16%

Lösung A	4.8 mL
Lösung B	5 mL
20% SDS	50 μ l
10% APS	100 μ l
TEMED	10 μ l
H₂O	50 μ l

Sammelgelzusammensetzung

Lösung A	1.5 mL
Lösung C	2.55 mL
20% SDS	50 μ l
10% APS	100 μ l
TEMED	10 μ l
H₂O	5.85 mL

Färbelösung: 45% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Eisessig, 45% (v/v) Wasser, 0.1% (w/v) Coomassie G Brilliant Blue, 0.3% (w/v) Coomassie B Brilliant Blue

Entfärber Lösung: 20% (v/v) Ethanol, 10% (v/v) Eisessig, 70% (v/v) Wasser

2.8 Verbrauchsmaterialien und Zubehör

Einmalküvetten	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Eppendorf Cups	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Latexhandschuhe	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Latexhandschuhe	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Nitrilhandschuhe	VWR (Ismaning, Deutschland)
Sterilfilter (Spritzenaufsätze)	Renner (Dannstadt, Deutschland)
Sterilfilter	Steritop, Millipore
Vivaspin 2, 6, 20	Vivascience, Sartorius (Göttingen, Deutschland)
5 mm NMR Tube 502-7	Norell (Landisville, USA)
5 mm NMR Tube 507-HP-7	Norell (Landisville, USA)

2.9 Geräte

2.9.1 Laborgeräte

4 °C Kühlschrank	„Öko“	Priveleg
-20 °C Kühlschrank	„Comfort“	Liebherr
-80 °C Kühlschrank	VX530 Series 2	Jouan
ÄKTA FPLC	ÄKTA™ FPLC + Frac-900	Amersham
Brutschrank	EB 53	Jouan
Eismaschine	AF 100	Scotsman
Feinwaage	CP64	Sartorius
Heizblöcke	Dri-Block® DB-2D	Techne
	QBD1	Grant

Inkubator	AJ 110	INFORS AG
Lyophilisiersystem	RCT 60 + Speed Vac RC 10	Jouan
Magnetrührer	MR 3001 K	Heidolph
Microwelle	R-26ST	Sharp
Miliporanlage	PURELAB Ultra	Elga
Netzgerät; für SDS-Gele	Power Pac 300	Bio-Rad
peristaltische Pumpe	Minipuls3	Gilson
Pipetten	Pipetman P2,P20,P200,P1000	Gilson
Reziproker Plattform Schüttler	PROMAX 1020	Heidolph
SDS-Gelkammer	MTV1	cti
Sterilbank	MSC.12 GS V G 2XE	Jouan
Thermocycler	Mastercycler personal	Eppendorf
Tischzentrifugen	Biofuge pico	Heraeus
	mini Spin	Eppendorf
Ultraschallgerät	J-17A	Branson
Ultrazentrifuge	L-70	Beckman
Vortex	Vortex-Genie 2TM	Scientific Ind.
Waage	PM600	Mettler
Wasserbäder	mit Rüttler	Memmert
Zentrifugen	J-6B	Beckmann
AvantiTM J-20	Beckmann	
AvantiTM J-25	Beckmann	

2.9.2 Messgeräte

Fourier-Transformations-Infrarotspektrometer	670 FT-IR	Varian
NMR-Spektrometer	Avance600; TXI CryoProbe	Bruker
	Avance800; TCI CryoProbe	Bruker
pH-Meter	Φ 32 pH Meter	Beckman
Photometer	Lambda Bio +	PerkinElmer
Transmissions-Elektronen - Mikroskop (TEM)	Philips CM12	FEI Electron Optics

Particle Sizer

HPPS5001

Malvern

2.10 Chromatographiesäulen

Anionenaustauscher:

HiLoad 60/16 Q Sepharose Fast Flow
GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)

Gelfiltration:

HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade
GE Healthcare (Freiburg, Deutschland)

2.11 Software

Office Excel 2007	Datenbearbeitung/Grafikerstellung	Microsoft
Office Word 2007	Dissertationserstellung	Microsoft
UNICORNTM C.S.	Steuerung der ÄKTA TM FPLC	Amersham
Translate	Translation DNA Sequenz	} http://www.expasy.ch
PeptideMass	Massenberechnung/Trypsinverdau	
Compute pI/Mw	Berechnung von MW und IEP	
Auremol 2.4.0	Strukturassignement	Lst. Kalbitzer
Origin 6.0	Diffusionsmessungen	Microcal Software Inc.
TOPSPIN 2.1	Prozessierung und Datenverarbeitung	Bruker
AdobeReader 9	PDF-Tool	Adobe
FastStone Capture	Screenshot-Tool	FastStone
CNS 1.1	Strukturberechnung	Brunger <i>et al.</i> 1998
MolMol	Darstellung von Strukturen	ETH Zürich, Wüthrich

3 Methoden

3.1 Molekularbiologische Methoden

3.1.1 Chromatographie

3.1.1.1 Größenausschlusschromatographie

Die Größenausschlusschromatographie bzw. Gelfiltration bietet die Möglichkeit einer Auftrennung von Proteingemischen anhand ihrer Größe. Hierbei legen kleinere Proteine aufgrund des porösen Säulenmaterials eine größere Wegstrecke zurück als große Proteine. Dies hat zur Folge, dass die Proteine mit abnehmender Größe eluieren.

Für die Reinigung der Proteingemische wurden ausschließlich eine HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade mit einem Flüssigkeitsvolumen von ca. 320 mL für größere Proteinmengen und eine kleine HiLoad 16/60 Superdex 75 prep grade mit etwa 120 mL Flüssigkeitsvolumen für kleinere Proteinmengen verwendet. Die Gelfiltrationen wurden über die ÄKTA™ FPLC + Frac-900 bei 4 °C durchgeführt. Die jeweilige Säule wurde nach dem Einbau zuerst mit H₂O millipore und anschließend mit 2 Säulenvolumen Lyophilisierpuffer bzw. Gelfiltrationspuffer (siehe 2.2) mit einer Flussrate von 2 mL/min äquilibriert. Danach wurde das aufzutrennende Proteingemisch mit einem möglichst kleinen Volumen (max. 2 mL) in den Injektionsloop (2 mL) der ÄKTA eingespritzt. Die Injektion und Auftragung des Proteingemisches auf das Säulenmaterial erfolgte bei einer Flussrate von 0.5 mL/min. Nach einem Durchflussvolumen von ca. 4 mL durch den Injektionsloop wurde die ÄKTA auf direkte Pufferzufuhr umgestellt und die Gelfiltration mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min fortgeführt. Das jeweilige Volumen der gesammelten Fraktionen variierte je nach Säulengröße zwischen 0.5-1 mL. Nach erfolgreicher Gelfiltration wurde die Säule bei einer Flussrate von 2 mL/min mit einem Säulenvolumen H₂O millipore und anschließend mit einem Säulenvolumen eines Gemisches aus 80% H₂O millipore und 20% Ethanol gespült und bei 4 °C aufbewahrt.

3.1.1.2 Ionenaustauschchromatographie

Bei der Ionenaustauschchromatographie bzw. der verwendeten Anionenaustauschchromatographie werden die Proteine anhand der partiell geladenen Seitengruppen reversibel an das jeweilige Trägermaterial (mit entgegengesetzter Polarität) der Säule gebunden. Nach der Auftragung und eines kurzen Pufferspülganges werden die gebundenen Proteine anschließend mit Hilfe eines Laufmittelgradienten (in den meisten Fällen eine Variation an Salzkonzentrationen) nach und nach je nach ihrer Elektronegativität von der Säule eluiert.

Für die Reinigung der großen Proteinmengen wurde eine HiLoad 60/16 Q-Sepharose Fast Flow verwendet. Hierbei wurde die Chromatographiesäule (HiLoad 26/10 Q Sepharose Fast Flow) in einem 4 Grad Kühlraum zuerst mit einem Säulenvolumen H₂O millipore und 2 Säulenvolumen Chromatographiepuffer I (siehe **Kapitel 2.2**) über ein Quetschpumpensystem mit 6 mL/min äquilibriert. Anschließend wurde das Proteingemisch mit 4 mL/min aufgetragen und mit einem Säulenvolumen Chromatographiepuffer I gespült, wobei ungebundene neutrale, bzw. positiv geladene Proteine sich zum größten Teil im Vorlauf befinden sollten. Es sei zu beachten, dass die maximale Proteinbeladung des Säulenmaterials nicht überschritten wird. Die Q-Sepharosesäule wurde nach dem Beladen in die Äkta eingebaut und die Elution mit einem NaCl-Gradienten von Chromatographiepuffer I und II (siehe **Kapitel 2.2**) mit einer Fließgeschwindigkeit von 4 mL/min und einer Gradientenmischzeit (0-100%) von 200 min fortgesetzt. Die in 10 mL Fraktionen gesammelten Proteine wurden anschließend über SDS-PAGE verifiziert wobei CanA und K₁-CanA ab einer NaCl-Konzentration von ca. 150 mM eluieren.

3.1.2 SDS-Page nach Laemmli

Zur Überprüfung der Proteingemische bei Expression und den entsprechenden Chromatographieschritten wurde eine SDS-PAGE nach Lämmli [40] durchgeführt.

Durch Zugabe von Natriumdodecylsulfat (SDS) werden die Proteinfragmente in ihrer Ladung maskiert und erhalten durch die Sulfatgruppe eine negative Gesamtladung.

Diese ist annähernd direkt proportional zur Molekularmasse, wodurch nach Anlegen eines elektrischen Feldes eine Auftrennung nach der molekularen Masse möglich ist. Kurze Polypeptidketten wandern hierbei schneller durch das polymere Acrylamid-Gel Netzwerk als große. Zusätzlich werden Proteine durch Natriumdodecylsulfat denaturiert und enthaltene Disulfidbrücken werden durch das β -Mercaptoethanol im Probenpuffer reduziert.

Die Puffer sowie die Gelzusammensetzungen entnehmen Sie bitte **Kapitel 2.7** SDS Gele.

16 μ L der Proteinprobe wurden mit 4 μ L 4 x SDS-Probenpuffer gut vermischt und für 5 min bei 100 °C inkubiert. Zur Homogenisierung wurde die Probe bei 13000 U/min zentrifugiert. Das vorgegossene Gel wurde in die Gelkammer eingesetzt und mit Laufpuffer befüllt. Die Probe wurde zu jeweils 18 μ L in die Geltaschen pipettiert, wobei 1 Geltasche 10 μ L Proteinstandard (siehe **Kapitel 2.6**) enthielt. Das SDS-Gel wurde für 45-50 min bei konstanter Stromstärke (35 mA) dem elektrischen Feld ausgesetzt und nach der Elektrophorese etwas Färbepuffer zugegeben. Das Gel wurde anschließend für 45 s in der Mikrowelle erwärmt und anschließend für 30 min auf dem Plattform Schüttler bei niedriger Rüttelzahl ruhen gelassen. Die Entfärbung wurde durch mehrmaliges behandeln mit frischer Entfärberlösung, kurzes Aufkochen in der Mikrowelle und Schütteln beschleunigt.

3.1.3 Western Blot

Western Blot / Immunblot ist ein Verfahren zur Übertragung von Proteinen auf Trägermembranen um sie anschließend über verschiedene Verfahren und Reaktionen nachzuweisen bzw. zu analysieren. Dabei kann die Übertragung entweder durch Kapillarwirkung, Diffusion oder Elektrophorese stattfinden.

Die Methode des „Western Blots“ wurde in dieser Arbeit ausschließlich zur Übertragung der Proteinbanden aus der SDS-Page auf eine Nitrocellulose-Membran verwendet. Die das Protein beinhaltene Trägermembran wurde anschließend für die N-terminalen Sequenzierung aufbereitet.

Für das Western Blotting wurden die Sammelgele der SDS-Page Gele entfernt und als Orientierungshilfe die linke untere Gelecke abgetrennt. Das Gel wurde anschließend für 10 min in Western-Blot-Puffer (siehe **Kapitel 2.2**) äquilibriert. Für das spätere Blotting wurden 6 Whatman Filterpapiere und die Nitrocellulose-Membran (Whatman Protran BA83, für Proteine ≤ 20 kDa) exakt auf die Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die Filterpapiere und die Membran wurden anschließend ebenfalls für 5 min im Western-Blot-Puffer äquilibriert. Für das Western-Blotting wurde folgende Schichtung durchgeführt. Zuerst wurde die Anoden-Plattform, darauf mittig zentriert 3 Lagen Filterpapier und anschließend die Membran platziert. Darauf folgten das SDS-Gel, sowie 3 weitere Lagen des Filterpapiers und letzten Endes die Kathoden-Plattform. Nach sanftem Zusammendrücken der Elektrodenplattformen wurde überschüssiger Puffer mit einem Papiertuch entfernt. Nach Anlegen einer konstanten 15 Volt Spannung wurde der Proteintransfer in ca. 40 min durchgeführt. Anschließend wurde die Membran mit einer Ponceau S Lösung (0,2% (w/v) Ponceau S in 3% (v/v) Trichloressigsäure) angefärbt. Die zu untersuchenden Proteinbanden wurden anschließend mit einem Skalpell halb aus der Membran getrennt und die Membran mehrfach mit H₂O millipore gespült, um das Färbemittel Ponceau S auszuwaschen. Die Proteinbanden wurden nach der Entfärbung vollständig ausgetrennt und der N-terminalen Sequenzierung zugeführt.

3.1.4 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

3.1.4.1 Konzentrationsbestimmung von Proteinen nach Bradford

Zur Konzentrationsbestimmung von Proteinen wurde die Lösung Roti®-Quant (5x Konzentrat; Roth) benutzt. Die konzentrierte Bradford-Lösung wurde 1:5 mit Wasser verdünnt und anschließend über einen Faltenfilter filtriert. Die Lösung wurde wie folgt geeicht. Hierzu wurden verschieden konzentrierte BSA-Lösungen in H₂O (Konzentrationen von 0.5 - 20 mg/mL) hergestellt und pro Messprobe je 1 μ L zu jeweils 1 mL der Bradfordlösung gegeben, gemischt und 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Am mit reiner Bradfordlösung als Blindwert geeichtem Photometer wurden anschließend die optischen Dichten der Proben bei $\lambda = 595$ nm bestimmt. Durch die verschiedenen OD-Werte wurde eine Eichgerade in Abhängigkeit der

BSA-Konzentration erstellt. Zur Proteinkonzentrations-Bestimmung wurde 1 µL der Proteinlösung mit 1 mL der verdünnten Bradfordlösung vermischt, 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und die Optische Dichte bei $\lambda = 595 \text{ nm}$ am Photometer bestimmt (verdünnte Bradfordlösung als Blindwert).

Über die Eichgeraden wurde anschließend die Proteinkonzentration ermittelt. Durch den großen variablen Bereich Fehlerquellen dieser Methode wurden für sehr genaue Proteinkonzentrationsbestimmungen die Konzentration entweder über UV bzw. Lyophilisation bestimmt.

3.1.4.2 Konzentrationsbestimmung von Proteinen über UV

Die Proteinkonzentration lässt sich bei bekanntem Extinktionskoeffizient über die Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ über das Lambert-Beersche-Gesetz berechnen (**Formel 3.1**) [38-39].

$$A(280 \text{ nm}) = \varepsilon(280 \text{ nm}) \cdot c \cdot d$$

Formel 3.1: A = Absorption, ε = Extinktionskoeffizient, c = Konzentration des Proteins, d = Schichtdicke der Küvette

Hierzu misst man die Absorption bei $\lambda = 280 \text{ nm}$ (H_2O als Blindwert) der um den Faktor 1:100 mit Wasser verdünnten konzentrierten Proteinlösung und löst das Lambert-Beersche-Gesetz nach der Konzentration auf. Der für CanA und K₁-CanA berechnete theoretische Extinktionskoeffizient [41,42] beträgt:

$$\varepsilon_{(\text{CanA bei } 280 \text{ nm})} = 24410 [\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}]$$

$$\varepsilon_{(\text{K1-CanA bei } 280 \text{ nm})} = 22920 [\text{cm}^{-1}\text{M}^{-1}]$$

3.1.5 Proteinkonzentrierung

Zur Proteinkonzentrierung wurden Konzentratoren der Vivaspin-Serie (Sartorius Stedim Biotech) verwendet. Die Konzentrierung findet hierbei durch Ultrafiltration über eine Membran in einer Hochleistungszentrifuge statt. Für CanA und K₁-CanA wurden hierbei Konzentratoren mit einer Ausschlussgröße von 10 kDa gewählt. Die Konzentratoren wurden vor der Proteinkonzentration mit dem entsprechenden Probenpuffer gefüllt und 10 min (für Viva-Spin2 bei 11000 g, Viva-Spin20 bei 8000 g) zentrifugiert um in der Membran enthaltene Glycin-Reste zu entfernen. Nach der Membranreinigung wurde die Proteinlösung schrittweise (je 20 min) bei 4° C zentrifugiert, wobei die Dichtheit der Membran über einen Bradford-Schnelltest (1 µL zentrifugierter Durchlauf + 20 µL verdünnte Bradford-Lösung, siehe 3.1.9.1) überprüft wurde. Das Konzentrat wurde gelegentlich resuspendiert um eine Verstopfung der Membran bzw. dem Aggregieren des Proteins vorzubeugen.

3.1.6 Lyophilisieren von Proteinen

Zur exakten Proteinmengenbestimmung sowie zur Haltbarkeitssteigerung wurden einige CanA und K₁-CanA Proben gefriergetrocknet. Die Lyophilisierung beruht auf dem physikalischen Prozess der Sublimation. Die mit Hilfe von Stickstoff eingefrorene Probe wird hierbei einem Hochvakuum ausgesetzt, wodurch die Eiskristalle des gefrorenen Lösungsmittels (H₂O) direkt in den gasförmigen Aggregatzustand übergehen, ohne den flüssigen Aggregatzustand zu erreichen. Das der Probe entzogene Wasser wird hierbei durch das Vakuum abgesaugt. Das verwendete Lyophilisiersystem bestand aus einem RCT 60 Kühlfallensystem und einem Speed Vac RC 10 System der Firma Jouan. Die jeweiligen Proben wurden entweder in H₂O (pH 7) oder in 50 mM NaHCO₃-Puffer (pH 7) umgepuffert und anschließend in 1 mL Aliquote in 1.5 mL Mikroreaktionsgefäße der Firma Eppendorf pipettiert. Die Proben wurden mit flüssigem Stickstoff eingefroren und anschließend der Deckel der Reaktionsgefäße durch einen zuvor perforierten Deckel ersetzt, damit bei der Lyophilisierung das gasförmige Wasser entweichen kann. Die Proben wurden daraufhin sofort in einen Lyophilisierungskolben überführt und bei 0.1 mPa für mindestens 12 h lyophilisiert.

3.1.7 Polymerisierung und Trypsinverdau

Die Eigenpolymerisationseigenschaften von CanA sind für längere NMR-Messreihen hinderlich, da größere Aggregate sowie auch unstrukturierte freie Enden von Proteinen bei der NMR zu starken Linienverbreiterungen führen. Es wurde deswegen versucht, durch einen Trypsinverdau den N-Terminus soweit abzuspalten bis CanA seine Polymerisationseigenschaften verlieren würde. Dieser Verdau wurde sowohl für CanA als auch für polymerisiertes CanA durchgeführt und der Verlauf über SDS-PAGE und NMR dokumentiert.

Für den Verdau wurde eine Trypsinverdauprobe mit 20 mg lyophilisiertem CanA in 1.04 mL TRIS Puffer (50 mM TRIS, 50 mM NaCl, 100 μ L D₂O, 4 μ L DSS (0.1 M)) hergestellt und anschließend in 2 identische Proben aliquotiert.

Eine der Proben wurde vor der Trypsinzugabe nach folgendem Schema polymerisiert und die Polymerisation per NMR dokumentiert. Die CanA Probe wurde in ein NMR-Tube überführt und nach der Aufnahme des Ausgangszustandes mit 10 μ L einer MgCl₂/CaCl₂-Stammlösung (je 1 M) versetzt und der Polymerisationsverlauf für 42 h bei 298 K per NMR detektiert. Anschließend wurden der Polymerprobe 90 μ L Puffer und 10 μ L D₂O zugesetzt, das NMR-Tube mit einem Vortex-Genie 2TM für 2 Sekunden homogenisiert und 100 μ L des homogenisierten Polymers für die SDS-PAGE Dokumentation entnommen.

Für den Trypsinverdau wurde eine Trypsinstammlösung aus 1 mg Trypsin (porcine pancreas Type II; 2000 U/mg) und 200 μ L TRIS-Puffer hergestellt (10 U pro μ L Trypsinstammlösung).

Der zum Trypsinverdau vorgesehenen CanA Probe wurden ebenfalls 90 μ L Puffer und 10 μ L D₂O zugesetzt, 100 μ L für die SDS-PAGE Dokumentation entnommen, in ein NMR-Tube überführt und ein Ausgangsspektrum der Probe gemessen. Da Trypsin bei 37°C seine maximale Aktivität entwickelt wurden die folgenden Experimente bei 310 K durchgeführt.

Den nacheinander an einem 600 MHz Spektrometer bei 310 K vermessenen Proben CanA und polymerisiertes CanA wurden 30 µL der Trypsinstammlösung zugegeben (30 U pro mg Protein) und der Trypsinverdau mit ^1H -Spektren (zgpw5-2d) dokumentiert. Zeitgleich erfolgte die Trypsinzugabe der SDS-PAGE Proben.

Die SDS-PAGE Referenzen wurden in 1.5 mL Eppendorf Cups mit 5.77 µL der Trypsinstammlösung vermischt und in einem Heizblock bei 310 K temperiert. Dem Eppendorf Cup wurden nach den folgenden Zeiten jeweils 10 µL Probe entnommen, mit 50 µL Puffer gemischt, in 3 Aliquote aufgeteilt und mit Stickstoff eingefroren um die Polymerisation zu stoppen.

Die Trypsin Entnahme bei CanA erfolgte nach Zeitintervallen 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 22 h, 46 h, 2 d 18 h und bei polymerisiertem CanA in den Zeitintervallen 0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 9 h, 24 h, 48 h, 2 d 21 h.

Die entnommenen Proben wurden am Ende des Verdaus aufgetaut und die Proteinfractionen wie in **Kapitel 3.1.2** beschrieben über SDS-PAGE getrennt. Die einzelnen Proteinbanden wurden anschließend mit einem Skalpell ausgeschnitten und der Massenspektrometrie (Edmann-Abbau) zugeführt.

3.1.8 Circulardichroismus-Spektroskopie

Die Circulardichroismus-Spektroskopie (CD-Spektroskopie) bedient sich des Effektes, dass chirale Moleküle (optisch aktive Substanzen) polarisiertes Licht (links-zirkular und rechts-zirkular) unterschiedlich stark absorbieren. Über die Absorbanzdifferenz bei links-zirkular und rechts-zirkular polarisiertem Licht (**Formel 3.2**) lässt sich die Elliptizität wie folgt errechnen (**Formel 3.3**).

$$\Delta A(\lambda) = [\varepsilon(l) - \varepsilon(r)] \cdot d \cdot c = \Delta \varepsilon \cdot d \cdot c$$

Formel 3.2: $\Delta A(\lambda)$ = Absorptionsdifferenz, c = Konzentration [mol/L], d = optische Weglänge in der Küvette [cm], $\varepsilon(l)$ und $\varepsilon(r)$ = molare Extinktionskoeffizienten in [mol $^{-1}$ cm $^{-1}$], $\Delta \varepsilon$ = Differenz der Extinktionskoeffizienten [mol $^{-1}$ cm $^{-1}$]

$$\Delta A(\lambda) = \frac{\theta(\lambda)}{32,98}$$

Formel 3.3: $\Delta A(\lambda)$ = Absorptionsdifferenz, $\theta(\lambda)$ = Elliptizität

Erhält man für $\Delta \epsilon$ ein positives Signal, bezeichnet man dies als positiven Cotton-Effekt und bei einem negativen $\Delta \epsilon$ Signal als negative Cotton-Effekte. Um anschließend eine Aussage über die Sekundärstruktur eines Moleküls treffen zu können, werden Vergleichsspektren bekannter Strukturen zur Validierung verwendet [26].

Die CD-Spektren wurden am Lehrstuhl von Prof. Dr. Sterner, Universität Regensburg, aufgenommen und die erhaltenen Datensätze über den Jasco Spectra Manager (Spectra Analysis) mit einem Algorithmus nach Savitzky-Golay gefittet.

Aus den gefitteten Daten konnte die molare Elliptizität nach **Formel 3.4** errechnet werden.

$$\theta_{MRW} = \frac{\theta \cdot M}{10 \cdot c \cdot d \cdot n_{AS}}$$

Formel 3.4: θ = Elliptizität [mdeg], M = molekulare Masse des Proteins [g/mol], c = Konzentration des Proteins [mg/mL], d = Schichtdicke der Küvette [cm] und n_{AS} = Anzahl der Aminosäuren des Proteins.

Die erhaltene Elliptizität sowie der restliche Datensatz wurden anschließend mit dem Analyseprogramm *CDSSTR* [19-21] des Online Servers DICHROWEB [18] ausgewertet. Es wurde die Referenzdatenbank 3 benützt [17].

Die erhaltenen Daten wurden anschließend mit Origin 6.0 ausgewertet.

3.1.9 Dynamische Licht Streuung

Mittels der Methode der Dynamischen Lichtstreuung (DLS) lässt sich die Dynamik von lichtstreuenden Teilchen und somit ihr Diffusionskoeffizient bestimmen.

Hierzu wird monochromatisch, kohärentes Licht (Laser) in die zu untersuchende Probe gestrahlt. Trifft das Licht auf Makromoleküle (wie z.B. ein Protein) wird es in alle Richtungen gestreut (Rayleigh-Streuung). Die Interferenzen des detektierten Streulichts von weiteren Streuzentren führen zu kleinen Fluktuationen in der Streuintensität, welche durch die Abstände der sich ständig bewegenden Streuzentren herrühren (Brownsche Molekularbewegung). Diese Fluktuationen werden anschließend gegen die Zeit aufgetragen, wodurch man Informationen über die Geschwindigkeit der Teilchen in Lösung erhält [37]. Durch diese Information lässt sich ein Diffusionskoeffizient ermitteln, welcher wiederum durch die Stokes-Einstein-Gleichung (für einen Partikel idealer Kugelform) den hydrodynamischen Radius des Partikels/Proteins liefert (**Formel 3.5**).

$$D = \frac{k \cdot T}{6 \cdot \pi \cdot \eta_0 \cdot R_h}$$

Formel 3.5: D = Diffusionskoeffizient, k = Boltzmann-Konstante. T = Temperatur, η_0 = Viskosität des Lösungsmittels, R_h = hydrodynamischer Radius

Mit dieser Methode lassen sich am besten und schnellsten unterschiedlich große Spezies (welche sich jedoch in ihrer Größe signifikant unterscheiden sollten) in einer gelösten Probe nachweisen, deren Struktur annähern kugelförmig ist.

Die DLS Messungen wurden an dem Lehrstuhl für Biochemie I Prof. em. Dr. Manfred Sumper, Universität Regensburg, an einem Particle Sizer HPPS5001 der Firma Malvern Instruments durchgeführt.

Versuchsdurchführung:

Etwa 1 h vor der eigentlichen Messung wurde der verwendete Laser eingeschaltet, um eine konstante Intensität der Photodiode zu gewährleisten.

Bei den DLS Messungen wurden zwei Aliquote einer CanA Proben in wässriger Lösung ($c(\text{CanA}) = 0.1 \text{ mM}$, 10 mM TRIS) bei unterschiedlichem pH ($\text{pH} = 6$ bzw. 9) vermessen.

Da kleinste Staubpartikel die Messung wegen ihrer Lichtstreuung stark beeinträchtigen würden, wurden besonders darauf geachtet, die Pufferlösungen sorgfältig zu filtrieren. Es wurde hierfür zum einen ein Sterilfilter (Steritop, Millipore) für die Pufferansätze der Proben als auch ein Sterilfilter mit Spritzenaufsatz und einer Porengröße von $0.2 \mu\text{m}$ zum mehrfachen Spülen der Messküvette verwendet. Die Probenvolumen für die Messung betrug $300 \mu\text{L}$. Zu Beginn wurde eine Blindprobe, die nur aus Pufferlösung bestand, zur Kalibrierung verwendet. Die Messküvetten mit den Proben wurden für je 30 min zur Temperierung in der Messapparatur belassen und währenddessen Testmessungen durchgeführt, um das geeignete Streulicht zu ermitteln. Es wurden anschließend pro Probe 5 Messungen durchgeführt, wobei nur je 3 Messungen für die Auswertung herangezogen wurden. Die nicht verwendeten Messungen wurden aufgrund überproportionaler Intensitätsanstiege (aufgrund von stark streuenden Staubpartikeln) verworfen. Die Messzeit betrug pro Messung ca. 4 min.

3.1.10 Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie

Über die Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie (FTIR-Spektroskopie) ist es möglich, Aussagen über die Amid-Banden eines Proteins und somit über die Sekundärstruktur zu treffen. Im Gegensatz zur herkömmlichen Infrarot-Spektroskopie mit dispersiven Messgeräten wird bei der FTIR-Spektroskopie die Messung nicht mehr für jede einzelne Wellenlänge durchgeführt. Mit Hilfe eines Interferometers (z.B. nach Michelson) wird die Strahlung der Quelle zur simultanen Messung des kompletten Spektralbereichs eingesetzt. Man erhält ein Interferogramm, welches ein großes Maximum (wo alle Frequenzen additiv interferiert haben) und relativ flache Ausläufer aufweist. Dieses Interferogramm muss anschließend noch über eine Fourier-Transformation in ein Spektrum umgewandelt werden.

Mittels dieser IR-Spektren ist es möglich, Aussagen über die Sekundärstruktur eines Proteins bzw. Sekundärstruktur-Vergleiche zwischen verschiedenen Proteinen zu treffen.

Ein typisches IR-Spektrum eines Proteins zeigt in der Regel die in

Tabelle 3.1 gezeigten IR-Absorptionsbanden [73-77]:

Amide A	3300 cm ⁻¹	NH Streckschwingung
Amide B	3100 cm ⁻¹	NH Streckschwingung
Amide I	1600-1690 cm ⁻¹	C=O Streckschwingung der Peptidbindung
Amide II	1480-1575 cm ⁻¹	CN Streckschwingung, NH Deformationsschwingung
Amide III	1229-1301 cm ⁻¹	CN Streckschwingung, NH Deformationsschwingung
Amide IV	625-767 cm ⁻¹	OCN Deformationsschwingung
Amide V	640-800 cm ⁻¹	out of plane NH Deformationsschwingung
Amide VI	537-606 cm ⁻¹	out of plane C=O Deformationsschwingung
Amide VII	200 cm ⁻¹	skeletal torsion

Tabelle 3.1: Charakteristische Infrarotabsorptionsbanden von Peptidbindungen

Ausschlaggebend für eine Aussage über die Sekundärstrukturelemente eines Proteins ist hierbei überwiegend die Amid I Bande.

Tabelle 3.2 gibt die Frequenzbereiche mit den dazugehörigen Strukturzuordnungen der Amid-I-Bande wieder [77-81].

Frequenz in H ₂ O	Strukturelement Zuordnung	Frequenz in D ₂ O	Strukturelement Zuordnung
1624 ± 1.0	β-Faltblatt	1624±4.0	β-Faltblatt
1627 ± 2.0	β-Faltblatt		
1633 ± 2.0	β-Faltblatt	1631±3.0	β-Faltblatt
1638 ± 2.0	β-Faltblatt	1637±3.0	β-Faltblatt
1642 ± 1.0	β-Faltblatt	1641±2.0	3 ₁₀ Helix
1648 ± 2.0	Random Coil	1645±4.0	Random Coil
1656 ± 2.0	α-Helix	1653±4.0	α-Helix
1663 ± 3.0	3 ₁₀ Helix	1663±4.0	β-Turn
1667 ± 1.0	β-Turn	1671±3.0	β-Turn
1675 ± 1.0	β-Turn	1675±5.0	β-Faltblatt
1680 ± 2.0	β-Turn	1683±2.0	β-Turn
1685 ± 2.0	β-Turn	1689±2.0	β-Turn
1691 ± 2.0	β-Faltblatt	1694±2.0	β-Turn
1696 ± 2.0	β-Faltblatt		

Tabelle 3.2: Frequenzen der Amid-I-Bande mit Sekundärstruktur Zuordnungen für Proteine in H₂O und D₂O

Die FTIR-Spektren wurden am Lehrstuhl von Prof. Dr. Pfitzner, Universität Regensburg, aufgenommen. Hierfür wurde jeweils ein stark konzentrierter Proteinfilm aus lyophilisierten CanA und lyophilisierten polymerisierten CanA in H₂O (ca. 1 mg Protein mit 5 µL H₂O) auf das Prisma des FT-IR-Spektrometers aufgetragen und unter Luft getrocknet. Messungen von CanA und polymerisiertem CanA in Lösung mussten leider aufgrund der starken H₂O Absorptionsbanden (auch in einer D₂O Lösung) verworfen werden.

3.1.11 Transmissions-Elektronenmikroskopie

Zur Untersuchung der polymerisierten Cannulae von CanA wurden Messungen mit einem Transmissions-Elektronen-Mikroskop (TEM) (Philips CM12 der Fa. FEI Electron Optics, Eindhoven, Niederlande) am Zentrum für Elektronenmikroskopie der

Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg in Zusammenarbeit mit Herrn Prof. Dr. Reinhard Rachel durchgeführt.

Die Cannulae des Proteins CanA eignen sich sehr gut für diese Messmethode, da sie alle nötigen Anforderungen der TEM erfüllen. Bei der TEM sollte die Objektdicke nicht mehr als 100 nm – 1 µm betragen und das zu untersuchende Objekt sollte im Hochvakuum und unter Elektronenbeschuss weder sublimieren noch seine Form verändern. Die Transmissionselektronenmikroskopie beruht auf der Durchdringung der Objektoberfläche des Messobjekts durch emittierte Elektronen. Die hohe Auflösung des TEM (bis zu 0.05 nm) im Gegensatz zu anderen optischen Verfahren (Lichtmikroskop ca. 200 nm) beruht auf der sehr viel kleineren Wellenlänge (Materiewellen) als bei sichtbarem Licht (**Formel 3.6**).

De Broglie

$$\lambda = \frac{h}{p}$$

$$p = \frac{mv}{\sqrt{1 - \left(\frac{v}{c}\right)^2}}$$

Formel 3.6: λ = Wellenlänge, h = plancksches Wirkungsquantum, p = relativistischer Impuls, m = Ruhemasse, v = Geschwindigkeit, c = Lichtgeschwindigkeit

Für die TEM Aufnahmen wurde sowohl Proben von CanA als auch von K₁-CanA zum größten Teil nach den Vorschriften von Bianca Mai [43] präpariert.

Die Polymerisationsansätze wurden in Eppendorf Cups bei 30 °C (Heizblock) für in der Regel durchschnittlich 12 - 14 h inkubiert. Kurz- (2 - 6 h) und Langzeitpolymerisationen (24 - 36 h) wurden ebenfalls durchgeführt.

Zusammensetzung eines Standard Polymerisationsansatzes:

50 – 100 µL Polymerisationspuffer (50 mM TRIS/HCl pH = 6.5; 80 mM NaCl; 2 mM MgCl₂; 2 mM CaCl₂; 0.4 mM NaN₃); c (CanA bzw. K₁-CanA) = 2 mg/mL;

Für diverse Zusatzversuche wurde sowohl die Proteinkonzentration

(c (CanA bzw. K₁-CanA) = 2 – 20 mg/mL) als auch die Salzkonzentrationen der 2 wertigen Kationen (1 – 10 mM MgCl₂; 1 – 10 mM CaCl₂) variiert.

Referenzproben von CanA, die nicht zur Polymerisierung angesetzt werden sollten, wurden keine zweiwertigen Kationensalze, dafür etwas EDTA zugegeben (1 µM EDTA).

Die Präparation der Grids sowie die TEM-Messung an sich erfolgten mit und durch Herrn Prof. Dr. Reinhard Rachel, Zentrum für Elektronenmikroskopie der Fakultät für Biologie und Vorklinische Medizin, Universität Regensburg.

Nach der Inkubationszeit wurden die zu messenden Monomer-Proben auf c (CanA) = 0.01 mM und die Polymer-Proben auf 0.05 mM bzw. 0.005 mM mit Polymerisierungspuffer ohne zweiwertige Kationen verdünnt. Danach wurden 5 µL der Rekonstitutionsansätze auf zuvor in einem Plasma-Cleaner (PDC-3XG) beglimmte Kupfernetzchen (400-Mesh) mit Kohlefolie pipettiert. Nach einer ca. 15 s langen der Absorptionsphase, wurde der Großteil des Flüssigkeitsvolumens der Suspension von der Unterseite des Grids mit einem Filterpapier abgezogen. Die Oberfläche des Grids wurde mit einem Tropfen H₂O_{bidest} gewaschen, wie vorher beschrieben abgezogen und anschließend mit einem Tropfen 2% Uranylacetat Lösung (pH = 4.5) belegt. Die Uranylacetat Lösung wurde für 1 min auf dem Grid belassen und anschließend ebenfalls von unten her mit einem Filterpapier abgezogen. Die Grids wurden daraufhin entweder bis zur Messung im Dunkeln, temperiert und unter Umluft Ausschluss gelagert oder gleich an einem Transmissions-Elektrodenmikroskop untersucht und die Bilder mit einer slow-scan-CCD-Kamera (TVIPS) digital aufgezeichnet.

3.1.12 In-vivo Expression von CanA und seinen Konstrukten

Um für die NMR-Spektroskopie ausreichende Proteinmengen zu erhalten, wurde CanA und seine Konstrukte mittels einer induzierten Überexpression in den rekombinanten *E. coli* Stämmen *E. coli* BL21(DE3) pLysS und *E. coli* BL21(DE3) exprimiert [11].

3.1.13 Anzucht der unmarkierten Expressionskulturen

Für die Expression wurde eine LB₀ Vorkultur (1% des gewünschten Volumens der Hauptkultur; 100 mL Vorkultur bei 10 L Hauptkultur) (2.4.1) mit den *E. coli* Stämmen zugehörigen Antibiotika versetzt [(*E. coli* BL21(DE3) + 0.1% Vol Carbenicillin (50 mg/L) (100 µL bei 100 mL Vorkultur); *E. coli* BL21(DE3) pLysS + 0.1% Vol Carbenicillin (50 mg/L) (100 µL bei 100 mL Vorkultur) + 0.2% Vol Chloramphenicol (34 mg/L) (100 µL bei 100 mL Vorkultur)], mit der entsprechenden Glycerinkultur des Expressionsstammes angeimpft und bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) über Nacht (ca. 16 h) inkubiert. Mittels der Vorkultur wurde anschließend die gewünschte Menge (10 L) der LB₀ Hauptkultur (+ Antibiotika, s.o.) beimpft und bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) bis zu einem OD₆₀₀ von 0.8 inkubiert. Die Induzierung der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe einer frisch hergestellten IPTG-Lösung (Endkonzentration 0.8 mM). Die Inkubationszeit nach der Induzierung betrug in der Regel 16 h. Nach der Inkubation wurde die Hauptkultur durch eine 25 minütige Zentrifugation (3800 rpm, 4 °C) in sedimentierte Bakterienrückstände und Überstand getrennt. Die sedimentierten Bakterienrückstände wurden über Nacht bei -20 °C eingefroren und der Überstand verworfen.

3.1.14 Anzucht ¹⁵N-, ¹³C- markierter Expressionskulturen mit Mediumwechsel und erhöhter Bakterienkonzentration

Es wurde Reihe von Miniatur-Expressions-Ansätzen zur Ermittlung der besten Expressionsbedingungen in unterschiedlichen Minimalmedien für die Labelung von CanA und K₁-CanA durchgeführt. Bei dieser Reihe wurde die Expressionsrate von CanA und K₁-CanA in den Minimalmedien Neidhardt-Minimalmedium und Neues Minimal Medium (NMM) getestet (Zusammensetzung siehe **Kapitel 2.4.1**).

Hierfür wurden folgende Variationen vorgenommen und die Expression wie weiter unten beschrieben durchgeführt:

c (Glucose) = 1 g, 2 g; c (IPTG) = 0.8 mM, 1.6 mM; Expressionszeit nach IPTG Zugabe = 7 h, 18 h

Dabei erwies sich die Zusammenstellung mit $c(\text{Glucose}) = 2 \text{ g}$, $c(\text{IPTG}) = 1.6 \text{ mM}$ und eine Expressionszeit von 18 h nach IPTG Zugabe am besten. Für CanA wurden jedoch mit dem Neidhardt Minimalmedium und für K₁-CanA mit dem Neue Minimalmedium die höchsten Ausbeuten erzielt.

Um einen minimalen Verbrauch an isotoopenmarkierten Edukten bei maximalem Proteingewinn zu bekommen, wurde (zu Beginn der Dissertation) eine Expression von unmarkierten Expressionskulturen in LB₀ (8 L) bis zu einer OD₆₀₀ von 0.8 durchgeführt (siehe **Kapitel 3.1.13**). Das erhaltene Bakterienrückstandspellet wurde mehrfach mit geringen Mengen an isotoopenmarkierten Neuen Minimal Medium (NMM) bzw. Neidhardt Minimalmedium gewaschen und der Überstand nach einer kurzen 10 minütigen Zentrifugation (3800 rpm, 35 °C) wieder verworfen. Das gereinigte Pellet wurde in der gewünschten Menge isotoopenmarkierten Mediums (2 L), welches vorher auf 30 °C vorgewärmt wurde, resuspendiert. Nach einer 30 minütigen Erholungsphase bei 37 °C wurde dem nun 4fach konzentrierten Expressionsansatz (OD₆₀₀ ca. 3.2) IPTG zugegeben (Endkonzentration 1.6 mM) um die Proteinexpression zu induzieren. Nach einer Inkubationszeit von 18 h wurde die isotoopenmarkierte Hauptkultur durch eine 25 minütige Zentrifugation (3800 rpm, 4 °C) in sedimentierte Bakterienrückstände und Überstand getrennt. Die sedimentierten Bakterienrückstände wurden über Nacht bei -20 °C eingefroren und der Überstand verworfen.

Die Expression mit Mediumwechsel und erhöhter Bakterienkonzentration ist jedoch nur bedingt zu empfehlen. Es werden zwar sehr hohe Proteinmengen (ca. 10 mg pro Liter Minimalmedium) erzielt, die vollständige Labelung des Proteins kann bei diesem Expressionsvorgang jedoch nicht gewährleistet werden. Erfahrungsgemäß beträgt die Labelung bei dieser Vorgehensweise nur ca. 20% für ¹³C und ca. 30% für ¹⁵N. Eine nahezu vollständige Labelung bei niedrigerer Proteinausbeute lieferte hingegen die Expression im Vollminimalmedium.

3.1.15 Anzucht ^{15}N -, ^{13}C - markierter Expressionskulturen im Vollminimalmedium

Für die Expression im Vollminimalmedium wurde eine 20 mL Vorkultur, wie in **Kapitel 3.1.13** beschrieben, in dem zu verwendenden Minimalmedium (Neidhardt-Minimalmedium bzw. Neues Minimal Medium; **Kapitel 2.4.1**) hergestellt. Mittels der Vorkultur wurde anschließend die gewünschte Menge (2 L) der Minimalmedium Hauptkultur (+ Antibiotika, **Kapitel 3.1.13**) beimpft und bei 37 °C unter Schütteln (220 rpm) bis zu einem OD_{600} von 0.8 inkubiert.

Die Induzierung der Proteinexpression erfolgte durch Zugabe einer frisch hergestellten IPTG-Lösung (Endkonzentration 0.8 mM). Die Inkubationszeit nach der Induzierung betrug 18 h. Nach der Inkubation wurde die Hauptkultur durch eine 25 minütige Zentrifugation (3800 rpm, 4 °C) in sedimentierte Bakterienrückstände und Überstand getrennt. Die sedimentierten Bakterienrückstände wurden über Nacht bei -20 °C eingefroren und der Überstand verworfen.

3.1.16 Reinigung von CanA und K_1 -CanA

3.1.16.1 Zellaufschluss

Zu Beginn der Arbeit wurde der Zellaufschluss wie von Bianca Mai und Katrin Singer mit Lysozym durchgeführt, indem pro g Zellpellet 4 mL Lysispuffer (50 mM NaH_2PO_4 , 300 mM NaCl, 10 mM Imidazol, pH = 8.0) zugegeben und unter Eiskühlung resuspendiert wurde. Zur Proteolyseinhibition wurde dem Ansatz eine kleine Spatelspitze Proteaseinhibitor Complete zugegeben. Nach der Resuspension (45 min) wurde dem Ansatz pro g Zellpellet 1 mg Lysozym beigelegt und 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 25 μL einer 6%igen Natriumdesoxycholat-Lösung pro mL Suspensionsansatz zugegeben und 30 min auf Eis inkubiert. Zur Denaturierung der DNA wurde eine Spatelspitze DNase I und 12 μL einer 1 molaren MgCl_2 -Lösung pro g Pellet zugesetzt und nochmals inkubiert.

Da CanA auf zweiwertige Kationen sehr sensitiv reagiert, wurde der beschriebene Zellaufschluss mit Lysozym verworfen und ein nativer Aufschluss mit Ultraschall stattdessen bevorzugt.

Hierbei wurde dem eingefrorenen Ansatz pro Gramm Pellet 4 mL gekühlter Aufschlusspuffer (50 mM TRIS/HCl pH = 7.4; 50 mM NaCl) zugegeben und das Pellet unter Rühren bei Eiskühlung 30 min resuspendiert. Der Suspensionsansatz wurde zu je 35 mL in 50 mL-Falcons umgefüllt und jeder Ansatz unter Eiskühlung mit dem Ultraschallgerät J-17A für 2 x 30 Sekunden aufgeschlossen. Die Ansätze wurden anschließend zentrifugiert (15000 rpm, 4 °C) um die unlöslichen Zellbestandteile abzutrennen und das Zelllysats zur Reinigung vorzubereiten.

3.1.16.2 Reinigung – Hitzeschritt

Da es sich bei CanA um ein thermophiles Protein handelt, wurde ein einfacher aber sehr effektiver Hitzeschritt durchgeführt. Hierzu wurden kleine 100 mL Erlenmeyerkolben (bessere Wärmeverteilung durch größere Oberfläche) zur Hälfte mit dem Zelllysats gefüllt und mit Alufolie abgedichtet. Die Erlenmeyerkolben wurden anschließend im Wasserbad bei 80 bis 100 °C für 10 - 15 min geschüttelt (für eine gleichmäßige Wärmeverteilung in der Proben) und anschließend 10 min auf Eis abgekühlt.

Das durch die Hitze teildenaturierte Zelllysats wurde anschließend zentrifugiert (20000 rpm, 4 °C, 30 min) und das Pellet verworfen.

3.1.16.3 Reinigung – Ionenaustauschchromatographie

Um die restlichen undenaturierten Proteine zu entfernen, wurde nach dem Hitzeschritt eine Anionenaustauschchromatographie (Q-Sepharose) durchgeführt. Hierbei wurde die Chromatographiesäule (HiLoad 26/10 Q Sepharose Fast Flow) mit einem Säulenvolumen H₂O und 2 Säulenvolumen Chromatographiepuffer I (siehe **Kapitel 2.2**) äquilibriert, das Protein aufgetragen und anschließend mit Chromatographiepuffer I gespült. Die Q-Sepharosesäule wurde nach dem Beladen in die Äkta eingebaut und eine Gradientenelution mit Chromatographiepuffer I und II (siehe **Kapitel 2.2**) durchgeführt. Folgende Einstellungen erzielten die besten

Trennungsergebnisse: Fließgeschwindigkeit: 4 mL/min, Gradientenmischzeit (0-100%): 200 min, Probenfraktionsgröße: 10 mL.

Das Protein eluierte ab einer NaCl-Konzentration von ca. 150 mM. Die Bestimmung der Fraktionsauswahl erfolgte über ein SDS-Gel (siehe **Kapitel 2.7**).

3.1.16.4 Reinigung - Größenausschlusschromatographie

Die vereinigten Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie wurden mittels eines Vivaspin 20 mL auf ein Volumen von max. 2 mL konzentriert (bei größeren Proteinmengen wurden mehrere Gelfiltrationen durchgeführt). Auf die in der Äkta eingebaute und mit Lyophilisierpuffer bzw. Gelfiltrationspuffer (siehe **Kapitel 2.2**) äquilibrierte Gelfiltrationssäule HiLoad 26/60 Superdex 75 prep grade wurden max. 2 mL des konzentrierten Proteins mit 0.5 mL/min aufgetragen und anschließend mit einer Fließgeschwindigkeit von 1 mL/min in 1 mL Fraktionen isokratisch eluiert. Die Proteinfaktionen (ca. ab dem 50 mL – 70 mL) wurden abermals mittels SDS-Gel verifiziert.

3.2 NMR Spektroskopie

3.2.1 Probenvorbereitung

Da für die Strukturaufklärung in der NMR unterschiedliche Isotopenmarkierungen benötigt werden, ist es notwendig, mehrere verschiedene NMR-Proben unter gleichen Bedingungen zu vermessen. Insbesondere ist hierbei auch die verringerte Haltbarkeit der Proben aufgrund der Eigenpolymerisation, sowie bedingt durch die langen Messzeiten der Triple-Resonanz-Spektren anzuführen.

Diesbezüglich wurde darauf geachtet, möglichst konstante Umgebungs- und Messbedingungen für das Protein zu gewährleisten. Das Probenvolumen lag in der Regel bei 0.5 mL. Die Messungen wurden in der Regel in 5 mm NMR-Röhrchen (Norell 502-7) durchgeführt. Die Proben wurden hierzu meist im lyophilisierten

Zustand eingewogen bzw. in Lösung mehrfach umgepuffert und die Konzentration mit Bradford und über UV bestimmt.

Die Messungen wurden hauptsächlich unter folgenden Bedingungen durchgeführt:

Proteinkonzentration:	0.5 – 1 mM
TRIS-Puffer:	50 mM TRIS/HCl pH = 6.6; 50 mM NaCl; 0.4 mM DSS; (0.2 – 0.4 mM NaN ₃ je nach Länge der Messzeit); 10% D ₂ O; (EDTA 0.1 mM)
Phosphat-Puffer (Strukturanalysen):	20 mM Na ₂ HPO ₄ /NaH ₂ PO ₄ pH = 6.6; 0.4 mM DSS; (0.2 – 0.4 mM NaN ₃ je nach Länge der Messzeit); 10% D ₂ O; (EDTA 0.1 mM)
Messtemperatur:	323 K

3.2.2 Verwendete NMR Pulsprogramme

3.2.2.1 1D Spektren

3.2.2.1.1 ¹H-Spektren

Bei den qualitativen eindimensionalen ¹H-Spektren wurde das Pulsprogramm **zgpgpw5** (*water suppression using watergate W5 pulse sequence with gradients; using double echo*) [51] verwendet. Je nach Proteinkonzentration und dem Signal zu Rauschen Verhältnis variierten die *number of scans* (NS) zwischen 16 - 64 (im Regelfall 32). Des Weiteren wurden folgende Einstellungen vorgenommen:

spectral width (SWH) = 8.5 kHz; *size of fid* (TD) = 64 k; *acquisition time* = 2 - 4 s; 90° *hard pulse length* (P1/P27) = 10-15 µs; *relaxation delay* (D1) = 1 - 2 s;

Für quantitative eindimensionale ^1H -Spektren zur Konzentrationsbestimmung wurde das Pulsprogramm **noesygppr1d** (*with presaturation during relaxation delay and mixing time and spoil gradient*) verwendet.

spectral width (SWH) = 8.5 kHz; size of fid (TD) = 32 - 64 K; acquisition time = 1.5 - 2.5 s; 90° hard pulse length (P1/P27) = 12 - 14 μs ; relaxation time (D1) = 20 s;

Vor der Prozessierung der Spektren wurden die FIDs mit einer Exponentialfunktion (EM) multipliziert (Linienverbreiterung (LB) **zgpgw5** = 2 Hz; **noesygppr1d** = 0.3 Hz). Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

3.2.2.2 Diffusionsmessungen

Für die Diffusionsmessungen wurden die ^1H -Pulsprogramme **stebpgp1s191d** (*1D sequence for diffusion measurement using stimulated echo; using bipolar gradient pulses for diffusion; using 1 spoil gradient; water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients*) für H_2O und **diffuledcsd2o** (*using bipolar gradients; presaturation during relaxation delay; echo suppression by a pair of orthogonal spin lock pulses; spoiler gradients during transverse evolution*) [52-54] für D_2O Messungen verwendet.

number of scans (NS) = 128; spectral width (SWH) = 8 - 8.5 kHz; size of fid (TD) = 64 K; acquisition time = 4 s; 90° hard pulse length (P1/P27) = 12 - 14 μs ; relaxation delay (D1) = 2 s;

Für die Diffusionsmessungen wurden, um die Stabilität des Gradientenfeldes zu gewährleisten, eine 20%ige Polyacrylamid- und als Temperaturstandard eine Methanol-Probe vermessen. Der Gradientenpuls wurde so eingestellt, dass der Signalabfall bei einem 90%igen Gradienten unter 20% des Anfangssignals lag. Die Messungen wurden in 5%-Gradient-Intervallen bei 318 K durchgeführt.

Vor der Fourier-Transformation wurden die FIDs mit einer Exponentialfunktion (EM) multipliziert (Linienverbreiterung (LB) = 2 Hz). Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

3.2.2.3 2D Spektren

3.2.2.3.1 ^{13}C -, ^{15}N - ^1H -HSQCs

Das HSQC-Experiment (*Heteronuclear Single Quantum Correlation*) ermöglicht die Detektion der Protonen durch Korrelation zwischen heteronuklearen Kernen ^1H und X (X = ^{13}C bzw. ^{15}N) über eine direkte, skalare $^1J_{\text{XH}}$ Kopplung (**Abbildung 3.1**)

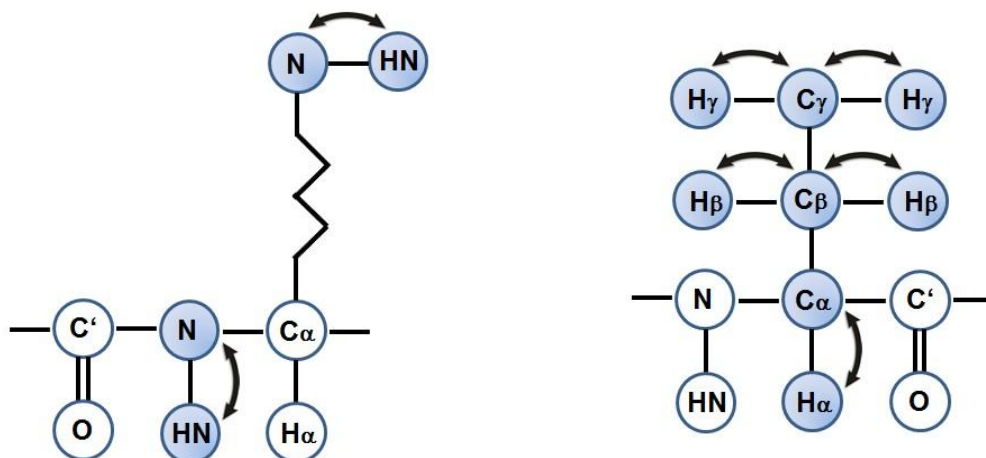


Abbildung 3.1: Magnetisierungstransfer-Schema des 2D ^{15}N - ^1H -HSQC (links) und des ^{13}C - ^1H -HSQC (rechts) Experimentes

Für zweidimensionale ^{13}C -/ ^{15}N - ^1H -HSQCs wurden die Pulsprogramme **hsqcetgpsi** (2D H-1/X correlation via double inept transfer; using sensitivity improvement; phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection; with decoupling during acquisition; using trim pulses in inept transfer) [45-47] und **hsqc3gpph19** (2D H-1/X correlation via double inept transfer; phase sensitive; with decoupling during acquisition; water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients) [48-50] verwendet. Die Anzahl der Scans (NS) wurde der Proteinkonzentration angepasst.

spectral width (SWH) $^1\text{H} = 8.5 \text{ kHz}$, $^{15}\text{N} = 2 \text{ kHz}$, $^{13}\text{C} = 12 \text{ kHz}$; *size of fid* (TD) $^1\text{H} = 2 \text{ K}$, ^{15}N und $^{13}\text{C} = 128$; *acquisition time* $^1\text{H} = 0.122 \text{ s}$, $^{15}\text{N} = 0.033 \text{ s}$, $^{13}\text{C} = 0.006 \text{ s}$; 90° *hard pulse length* $^1\text{H} = 11.5\text{-}13.5 \text{ }\mu\text{s}$, $^{15}\text{N} = 40 \text{ }\mu\text{s}$, $^{13}\text{C} = 14.5 \text{ }\mu\text{s}$; *relaxation delay* (D1) = 1.2 s;

Vor der Prozessierung der Spektren wurden die FIDs mit einer Exponentialfunktion (EM) multipliziert (Linienverbreiterung (LB) = 2 Hz). Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

3.2.2.3.2 TOCSY

Bei einem TOCSY-Spektrum (*T*otal *C*orrelated *S*pectroscopy) wird die Magnetisierung über ein komplettes Spinsystem einer Aminosäure durch aufeinanderfolgende skalare Kopplung transferiert (**Abbildung 3.2**). Somit ergeben sich Kreuzsignale zwischen allen an einem Spinsystem beteiligten Protonenkernen ($^3J_{\text{HH}}$ -Kopplung) mit für viele Aminosäuren charakteristischen Mustern.

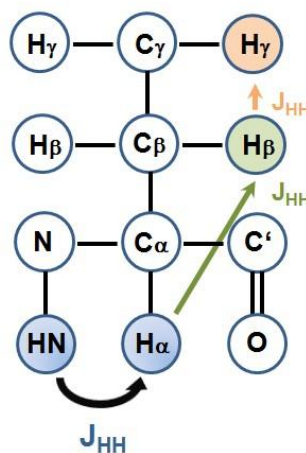


Abbildung 3.2: Magnetisierungstrfer-Schema des 2D TOCSY Experimentes

Für die homonuklearen TOCSY-Spektren wurde das Pulsprogramm **mlevgp_{pph}19** (*homonuclear Hartman-Hahn transfer using MLEV17 sequence for mixing using two power levels for excitation and spinlock, phase sensitive, water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients*) [49,50,55] verwendet.

spectral width (SWH) ^1H direct = 7.5 kHz, ^1H indirect = 7.5 kHz; *size of fid* (TD) ^1H direct = 4 K, *size of fid* (TD) ^1H indirect = 1 K; *acquisition time* ^1H direct = 0.275 s, ^1H indirect = 0.069 s; *90° hard pulse length* ^1H = 12 - 13 μs ; *relaxation delay* (D1) = 1.5 s; *mixing time* = 60 bzw. 80 ms

Vor der Fourier-Transformation wurden die FIDs mit einer Lorentz-to-Gauss-Funktion (GM) multipliziert (Linienverbreiterung (LB) direkt = -6 Hz, indirekt = -8 Hz; max. Wert der Gaussverbreiterung (GB) direkt = 0.2, indirekt = 0.1). Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

3.2.2.3.3 NOESY

Der Unterschied bei einem NOESY-Experiment (*Nuclear Overhauser Effect Spectroscopy*) im Vergleich zu anderen zweidimensionalen Verfahren ist, dass die Magnetisierung nicht über skalare Spin-Spin-Kopplungen zwischen den Kernen, sondern eine Wechselwirkungen zwischen den koppelnden Kerndipolen erfolgt, wodurch die Magnetisierung direkt über den Raum übertragen werden kann. Diese Art des Magnetisierungstransfers erfolgt über den Kern-Overhauser-Effekt (**Abbildung 3.3**).

Mittels eines homonuklearen NOESY-Experiments ist es somit möglich, auch die Abstände zwischen nicht durch feste Bindungen verbundenen Protonen über deren Volumina zu detektieren. Die Intensität der NOEs ist in erster Näherung proportional zu r^{-6} , wobei r der Abstand zwischen den Protonen ist.

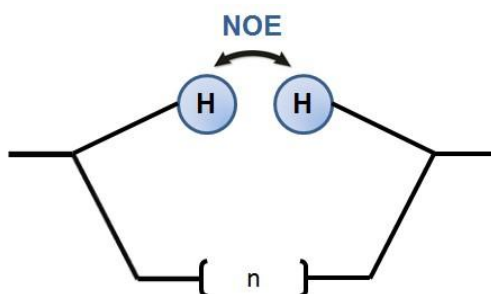


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des NOE-Effektes in einem 2D NOESY Experiment

Für homonukleare NOESY Messungen in H₂O bzw. D₂O wurden folgende Pulsprogramme bei verwendet:

noesygp^{ph}19 (2D homonuclear correlation via dipolar coupling, dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange, phase sensitive, water suppression using 3-9-19 pulse sequence with gradients) [49,50]

noesyph^{pr} (2D homonuclear correlation via dipolar coupling, dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange, phase sensitive, with presaturation during relaxation delay and mixing time)

spectral width (SWH) ¹H direct = 7.5 kHz, ¹H indirect = 7.5 kHz; size of fid (TD) ¹H direct = 4 K, size of fid (TD) ¹H indirect = 1 K; acquisition time ¹H direct = 0.275 s, ¹H indirect = 0.069 s; 90° hard pulse length ¹H = 11.5 - 12.5 µs; relaxation delay (D1) = 2 s;

Vor der Prozessierung der Spektren wurden die FIDs mit einer Lorentz-zu-Gauss-Funktion (GM) multipliziert (Linienverbreiterung (LB) direkt = -6 Hz, indirekt = -8 Hz; max. Wert der Gaussverbreiterung (GB) direkt = 0.12, indirekt = 0.1). Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

3.2.2.3.4 Aromaten Experimente 2D (HB)CB(CGCC_TOCSY)Har und 2D (HB)CB(CGCD)HD

Über die zweidimensionalen Aromaten Experimente (HB)CB(CGCC_TOCSY)Har und (HB)CB(CGCD)HD ist es möglich (in Kombination mit TOCSY und NOESY Spektren), die Protonen der aromatischen Ringe der Seitenketten eines Proteins zu ermitteln. Der Magnetisierungstransfer erfolgt ausgehend von ¹H_β zu ¹³C_β (t1), von ¹³C_β zu ¹³C_γ und von hier aus zu den entsprechenden ¹³C_{aro} und ihren zugehörigen ¹H_{aro} (t2) (**Abbildung 3.4**).

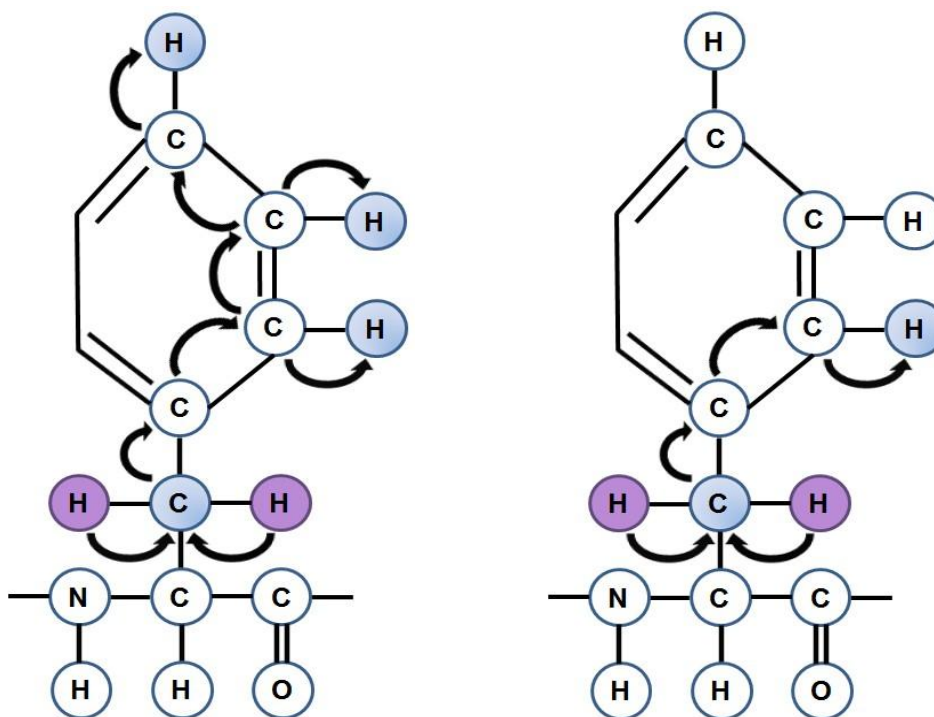


Abbildung 3.4: Magnetisierungstransfer-Schema des 2D (HB)CB(CGCC_TOCsy)Har (links) und (HB)CB(CGCD)HD (rechts) Experimentes

Hierfür wurden zwei Aromaten Experimente aufgenommen:

Zur Definierung der H δ wurde das Experiment **hbcbcgcdhdgp** (2D sequence with inverse correlation for triple resonance using inept transfer steps, on/off resonance C_{β} and C_{α} pulses using shaped pulse, phase sensitive (t1)) [66] aufgenommen.

Für die restlichen Aromatenprotonen wurde das Experiment **hbcbcgcchrgp** (2D sequence with inverse correlation for triple resonance using inept transfer steps, on/off resonance C_{β} and C_{α} pulses using shaped pulse, phase sensitive (t1)) [65-66] aufgenommen.

spectral width (SWH) ^1H = 9.6 kHz, ^{13}C = 6 kHz; size of fid (TD) ^1H = 2 K, ^{13}C = 80; acquisition time ^1H = 0.106 s, ^{13}C = 0.007 s; 90° hard pulse length ^1H = 13 μs , ^{13}C = 14.5 μs ; relaxation delay (D1) = 1 s;

Vor der Prozessierung der Spektren wurden die FIDs mit einer um 90° verschobenen quadratischen Sinusfunktion multipliziert (QSINE, SSB = 2). Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

3.2.2.4 3D Spektren

3.2.2.4.1 ^{15}N -NOESY-HSQC

Zur besseren NOE-Zuordnung der zweidimensionalen NOESY-Spektren wurde ein dreidimensionales ^{15}N -NOESY-HSQC an einem 900 MHz Spektrometer (Arbeitskreis Prof. Dr. Dr. h.c. Kessler, TU München) gemessen. Durch die zusätzliche ^{15}N -Ebene ließen sich die NOE-Spinsysteme besser voneinander trennen.

Die Magnetisierung wird hierbei zwischen allen Protonen mit NOE-Effekt ausgetauscht, zum benachbarten ^{15}N und zur Detektion zurück zu ^1H transferiert (**Abbildung 3.5**).

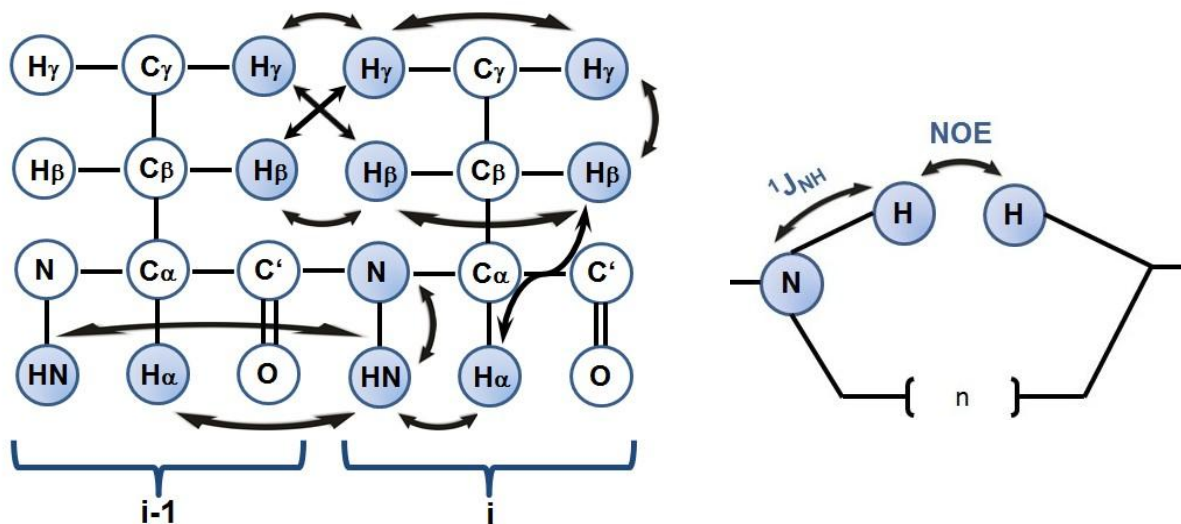


Abbildung 3.5: Magnetisierungstransfer-Schema des 3D ^{15}N -NOESY-HSQC Experimentes (links) und schematische Darstellung des NOE-Effektes und des Magnetisierungstransfers auf ^{15}N

Es wurde das Pulsprogramm **noesyhsqcetf3gp3d** (3D *sequence with homonuclear correlation via dipolar coupling*, *dipolar coupling may be due to noe or chemical exchange*, *H-1/X correlation via double inept transfer*, *phase sensitive (t1)*, *phase sensitive using Echo/Antiecho-TPPI gradient selection (t2)*, *using trim pulses in inept transfer with decoupling during acquisition*) verwendet [56].

spectral width (SWH) ^1H direct = 12.6 kHz, ^{15}N = 3 kHz, ^1H indirect = 12.6 kHz; *size of fid* (TD) ^1H direct = 2 K, ^{15}N = 64, ^1H indirect = 128; *acquisition time* ^1H direct = 0.081 s, ^{15}N = 0.011 s, ^1H indirect = 0.005 s; *90° hard pulse length* ^1H direct = 9.8 μs , ^{15}N = 39.5 μs , ^1H indirect = 9.8 μs ; *relaxation delay* (D1) = 1 s;

Vor der Fourier-Transformation wurden die FIDs in den direkten und indirekten Dimensionen mit einer Lorentz-zu-Gauß-Transformation multipliziert, um die Auflösung zu erhöhen. (Linienverbreiterung (LB) ^1H direkt = -6 Hz, ^1H indirekt = -20 und ^{15}N = -8; max. Wert der Gaussverbreiterung (GB) ^1H direkt = 0.12, ^1H indirekt = 0.1 und ^{15}N = 0.1). Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

3.2.2.4.2 HNCO

Mittels des dreidimensionalen HNCO Experiments ist es möglich, eine sequentielle Rückgratverknüpfung zwischen dem ^{15}N - ^1H Paar einer Aminosäure *i* mit der ^{13}CO -Gruppe der vorangehenden Aminosäure *i-1* zu bekommen. Man benötigt hierfür eine ^{13}C und ^{15}N isotopenmarkierte Proteinprobe. Die Magnetisierung erfolgt hierbei ausgehend von ^1HN zu ^{15}N über eine $^1\text{J}_{\text{NH}}$ Kopplung und von ^{15}N zu ^{13}CO über eine $^1\text{J}_{\text{NCO}}$ Kopplung und wieder zurück mit *t1*, *t2* und *t3* (**Abbildung 3.6**). Aus dem HNCO-Experiment erhält man somit die chemischen Verschiebungen der CO-Gruppen von *i-1* des Proteinrückgrats zur Strukturbestimmung.

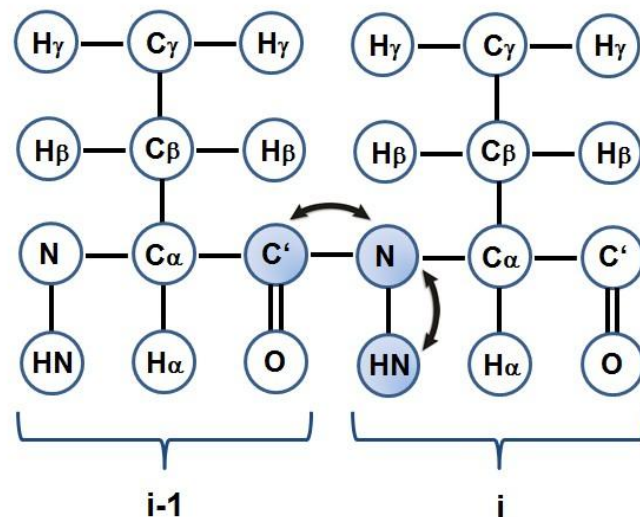


Abbildung 3.6: Magnetisierungstransfer-Schema des 3D HNCO Experimentes

Es wurde das Pulsprogramm **hncogpwg3d** (*3D sequence with inverse correlation for triple resonance using multiple inept transfer steps, on/off resonance Ca and C=O pulses using shaped pulse, phase sensitive (t1), phase sensitive (t2), using constant time in t2, water suppression using watergate sequence*) [57-59] verwendet.

spectral width (SWH) ^1H = 8.5 kHz, ^{15}N = 2 kHz, ^{13}C = 2 kHz; *size of fid (TD)* ^1H = 2 K, ^{15}N und ^{13}C = 64; *acquisition time* ^1H = 0.122 s, ^{15}N = 0.016 s, ^{13}C = 0.018 s; *90° hard pulse length* ^1H = 13 μs , ^{15}N = 40 μs , *shaped pulse length* ^{13}C = 400 μs ; *relaxation delay (D1)* = 1 s;

Vor der Prozessierung der Spektren wurden die FIDs in den indirekten Dimensionen (^{15}N und ^{13}C) mit einer um 90° verschobenen quadratischen Sinusfunktion multipliziert (QSINE, SSB = 2). In der direkten Dimension (^1H) wurde eine Lorentz-zu-Gauß-Transformation angewandt, um die Auflösung zu erhöhen. (Linienverbreiterung (LB) ^1H = -6 Hz, ^{15}N und ^{13}C = -8; max. Wert der Gaussverbreiterung (GB) ^1H = 0.12). Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

The diagram illustrates the chemical structure of a protein backbone segment, showing the interaction between residues $i-1$ and i . The structure includes atoms H_γ , C_γ , H_β , C_β , N , C_α , HN , H_α , C' , and O . Curved arrows indicate the movement of electron pairs, specifically from the $C_\alpha-N$ bond to the nitrogen atom and from the $C_\beta-C_\alpha$ bond to the C_α atom. Brackets below the structure label the residues as $i-1$ and i .

Zur C_α Detektion wurde das Pulsprogramm **hncagpwg3d** (3D sequence with inverse correlation for triple resonance using multiple inept transfer steps, on/off resonance Ca and C=O pulses using shaped pulse, phase sensitive (t1), phase sensitive (t2), using constant time in t2, water suppression using watergate sequence) [57, 59-61] verwendet.

spectral width (SWH) $^1\text{H} = 8.5 \text{ kHz}$, $^{15}\text{N} = 2 \text{ kHz}$, $^{13}\text{C} = 6 \text{ kHz}$; *size of fid* (TD) $^1\text{H} = 2 \text{ K}$, $^{15}\text{N} = 64$, $^{13}\text{C} = 64$; *acquisition time* $^1\text{H} = 0.122 \text{ s}$, $^{15}\text{N} = 0.016 \text{ s}$, $^{13}\text{C} = 0.011 \text{ s}$; 90° *hard pulse length* $^1\text{H} = 13 \mu\text{s}$, $^{15}\text{N} = 40 \mu\text{s}$, *shaped pulse length* $^{13}\text{C} = 400 \mu\text{s}$; *relaxation delay* (D1) = 1 s;

Vor der Fourier-Transformation wurden die FIDs in den indirekten Dimensionen (^{15}N und ^{13}C) mit einer um 90° verschobenen quadratischen Sinusfunktion multipliziert (QSINE, SSB = 2). In der direkten Dimension (^1H) wurde eine Lorentz-zu-Gauß-Transformation angewandt, um die Auflösung zu erhöhen. Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

3.2.2.4.4 CBCA(CO)NH

Das dreidimensionale CBCA(CO)NH steuert der Zuordnung des Proteinrückgrats die chemischen Verschiebungen von C_α und C_β der Aminosäure $i-1$ bei. Die Magnetisierung erfolgt ausgehend von der Aminosäure $i-1$ von $^1\text{H}_\alpha$ und $^1\text{H}_\beta$ zu $^{13}\text{C}_\alpha$ und $^{13}\text{C}_\beta$ und anschließend von $^{13}\text{C}_\beta$ zu $^{13}\text{C}_\alpha$. Von $^{13}\text{C}_\alpha$ erfolgt der Transfer zu ^{13}CO von $i-1$, dann zu $^{15}\text{N}_\text{H}$ von i und letztendlich zu $^1\text{H}_\text{N}$ (**Abbildung 3.8**). Die chemische Verschiebung entwickelt sich dabei gleichzeitig für $^{13}\text{C}_\alpha$ und $^{13}\text{C}_\beta$, so dass diese zusammen eine Dimension und $^{15}\text{N}_\text{H}$ bzw. $^1\text{H}_\text{N}$ die anderen Dimensionen für sich einnehmen.

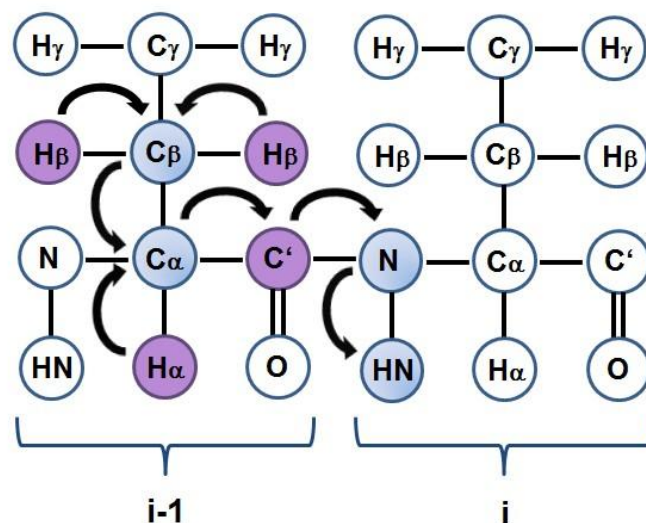


Abbildung 3.8: Magnetisierungstransfer-Schema des 3D CBCA(CO)NH Experimentes

Es wurde das Pulsprogramm **cbcaconhgpwg3d** (*3D sequence with inverse correlation for triple resonance using inept transfer steps, on/off resonance Ca and C=O pulses using shaped pulse, phase sensitive (t1), phase sensitive (t2), using constant time in t1, using constant time in t2, water suppression using watergate sequence*) [62-64] verwendet.

spectral width (SWH) $^1\text{H} = 8.5 \text{ kHz}$, $^{15}\text{N} = 2 \text{ kHz}$, $^{13}\text{C} = 11.5 \text{ kHz}$; *size of fid (TD)* $^1\text{H} = 2 \text{ K}$, $^{15}\text{N} = 64$, $^{13}\text{C} = 128$; *acquisition time* $^1\text{H} = 0.122 \text{ s}$, $^{15}\text{N} = 0.016 \text{ s}$, $^{13}\text{C} = 0.006 \text{ s}$; *90° hard pulse length* $^1\text{H} = 12.8 \mu\text{s}$, $^{15}\text{N} = 40 \mu\text{s}$, *shaped pulse length* $^{13}\text{C} = 400 \mu\text{s}$; *relaxation delay (D1)* = 1 s;

Vor der Fourier-Transformation wurden die FIDs in den indirekten Dimensionen (^{15}N und ^{13}C) mit einer um 90° verschobenen quadratischen Sinusfunktion multipliziert (QSINE, SSB = 2). In der direkten Dimension (^1H) wurde eine Lorentz-zu-Gauß-Transformation angewandt, um die Auflösung zu erhöhen. (Linienverbreiterung (LB) $^1\text{H} = -6 \text{ Hz}$, ^{15}N und $^{13}\text{C} = -8$; max. Wert der Gaussverbreiterung (GB) $^1\text{H} = 0.12$). Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

3.2.2.4.5 CBCANH

Bei einem dreidimensionalen CBCANH Experiment erfolgt der Magnetisierungstransfer ähnlich dem CBCA(CO)NH, ausgehend von der Aminosäure i-1 und von i von $^1\text{H}_\alpha$ und $^1\text{H}_\beta$ zu $^{13}\text{C}_\alpha$ und $^{13}\text{C}_\beta$ und anschließend von $^{13}\text{C}_\beta$ zu $^{13}\text{C}_\alpha$. Von $^{13}\text{C}_\alpha$ (t1) erfolgt der Magnetisierungstransfer zu ^{15}N (t2) und letztendlich zu $^1\text{H}_\text{N}$ (t3) (**Abbildung 3.9**). Ein weiterer Transfer kann von $^{13}\text{C}_{\alpha i-1}$ zu $^{15}\text{N}_{i-1}$ auftreten. Daher sind für jede NH Gruppe sowohl die C_α und C_β Peaks der Aminosäure i und deren Vorgänger i-1 im Spektrum sichtbar. Die chemische Verschiebung entwickelt sich gleichzeitig für $^{13}\text{C}_\alpha$ und $^{13}\text{C}_\beta$ wodurch sie in einer Dimension auftreten, während die chemischen Verschiebungen von $^1\text{H}_\text{N}$ und $^{15}\text{N}_\text{H}$ die anderen zwei Dimensionen ergeben.

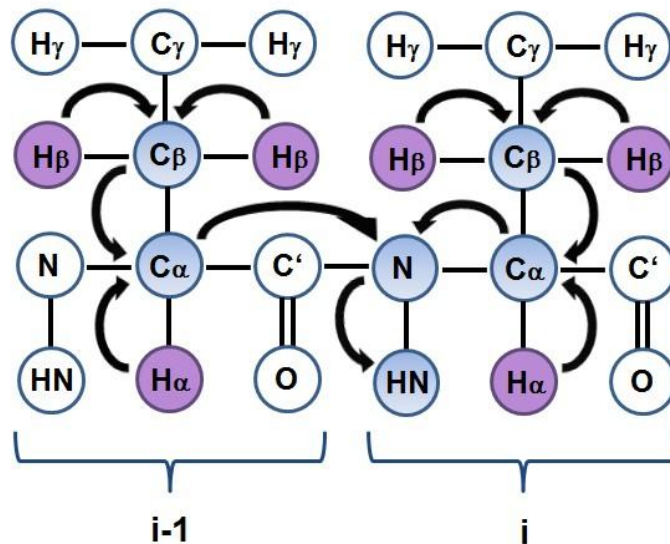


Abbildung 3.9: Magnetisierungstransfer-Schema des 3D CBCANH Experimentes

Das verwendete Pulsprogramm für die CBCANH Messung war **cbcanhgpwg3d** (*3D sequence with inverse correlation for triple resonance using inept transfer steps, on/off resonance Ca and C=O pulses using shaped pulse, phase sensitive (t1), phase sensitive (t2), using constant time in t1, using constant time in t2, water suppression using wtergate sequence*) [67].

spectral width (SWH) $^1\text{H} = 8.5 \text{ kHz}$, $^{15}\text{N} = 2 \text{ kHz}$, $^{13}\text{C} = 11.5 \text{ kHz}$; *size of fid* (TD) $^1\text{H} = 2 \text{ K}$, $^{15}\text{N} = 64$, $^{13}\text{C} = 128$; *acquisition time* $^1\text{H} = 0.122 \text{ s}$, $^{15}\text{N} = 0.016 \text{ s}$, $^{13}\text{C} = 0.006 \text{ s}$; *90° hard pulse length* $^1\text{H} = 12.8 \text{ }\mu\text{s}$, $^{15}\text{N} = 40 \text{ }\mu\text{s}$, *shaped pulse length* $^{13}\text{C} = 400 \text{ }\mu\text{s}$; *relaxation delay* (D1) = 1 s;

Vor der Fourier-Transformation wurden die FIDs in den indirekten Dimensionen (^{15}N und ^{13}C) mit einer um 90° verschobenen quadratischen Sinusfunktion multipliziert (QSINE, SSB = 2). In der direkten Dimension (^1H) wurde eine Lorentz-zu-Gauß-Transformation angewandt, um die Auflösung zu erhöhen. (Linienverbreiterung (LB) $^1\text{H} = -6 \text{ Hz}$, ^{15}N und $^{13}\text{C} = -8$; max. Wert der Gaussverbreiterung (GB) $^1\text{H} = 0.12$). Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

3.2.2.4.6 HCCH-TOCSY

Das HCCH-TOCSY ist unerlässlich für das Seitenkettenassignment. Die Magnetisierung wird hierbei von den Seitenkettenprotonen ausgehend (t1) auf ihre ^{13}C Bindungspartner (t2) (isotropic ^{13}C mixing) und zurück zu den Seitenkettenprotonen übertragen (t3) (**Abbildung 3.10**). Man erhält hierdurch ein Spektrum in dem sämtliche Protonenresonanzen (nur solche Protonen, welche einen ^{13}C Bindungspartner hatten) der Seitenketten mit der Frequenz jedes ^{13}C Atoms gekoppelt sind. Auf der Diagonalen des Spektrums befindet sich jeweils der zu jedem ^{13}C Atom zugehörige direkte Protonenbindungspartner. Die Spektren wurden in D_2O aufgenommen.

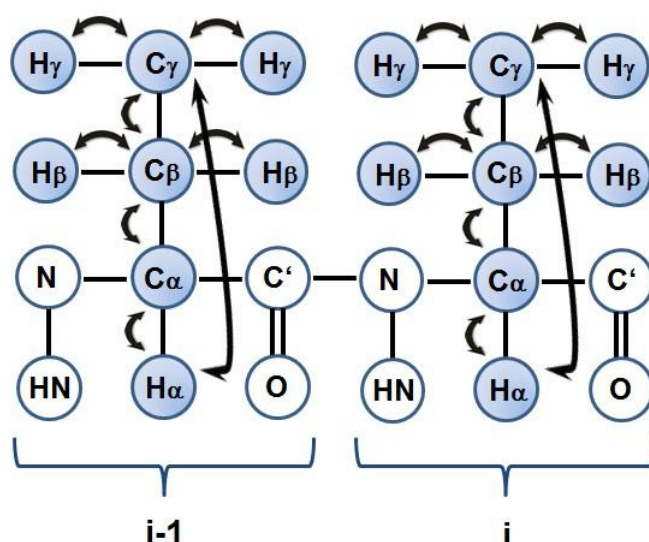


Abbildung 3.10: Magnetisierungstransfer-Schema des 3D HCCH-TOCSY Experimentes

Für das HCCH-TOCSY wurde das Pulsprogramm **hcchdigp3d** (*3D sequence with inverse correlation using multiple inept transfer and C-C DIPSI3 spinlock, off resonance C=O pulse using shaped pulse, phase sensitive (t1), phase sensitive (t2), spinlock during z-filter*) [68-70] verwendet.

spectral width (SWH) ^1H direct = 8.5 kHz, ^{13}C = 12 kHz, ^1H indirect = 6.6 kHz ; *size of fid* (TD) ^1H direct = 2 K, ^{13}C = 88, ^1H indirect = 128; *acquisition time* ^1H = 0.122 s, ^{15}N = 0.004 s, ^{13}C = 0.010 s; *90° hard pulse length* ^1H = 13.3 μs , ^{13}C = 14.5 μs ; *relaxation delay* (D1) = 1.1 s;

Vor der Fourier-Transformation wurden die FIDs in den indirekten Dimensionen (^{15}N und ^{13}C) mit einer um 90° verschobenen quadratischen Sinusfunktion multipliziert (QSINE, SSB = 2). In der direkten Dimension (^1H) wurde eine Lorentz-zu-Gauß-Transformation angewandt, um die Auflösung zu erhöhen. (Linienverbreiterung (LB) ^1H direkt = -6 Hz, ^1H indirekt und ^{13}C = -8; max. Wert der Gaussverbreiterung (GB) ^1H = 0.12). Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

3.2.2.4.7 HCAN

Mittels des HCAN-Pulsprogrammes ist es möglich, die komplette Zuordnung des Proteinerückgrats in Bezug auf die Sequenz zu validieren und $^1\text{H}_\alpha$, $^{13}\text{C}_\alpha$ und $^{15}\text{N}_\text{H}$ der Proline zu erhalten. Die Magnetisierung erfolgt hierbei über $^1\text{H}_\alpha$ von i-1 auf $^{13}\text{C}_\alpha$ von i-1, anschließend auf $^{15}\text{N}_\text{H}$ von i und i-1 und der Rücktransfer mit den Relaxationszeiten t1, t2 und t3 (**Abbildung 3.11**).

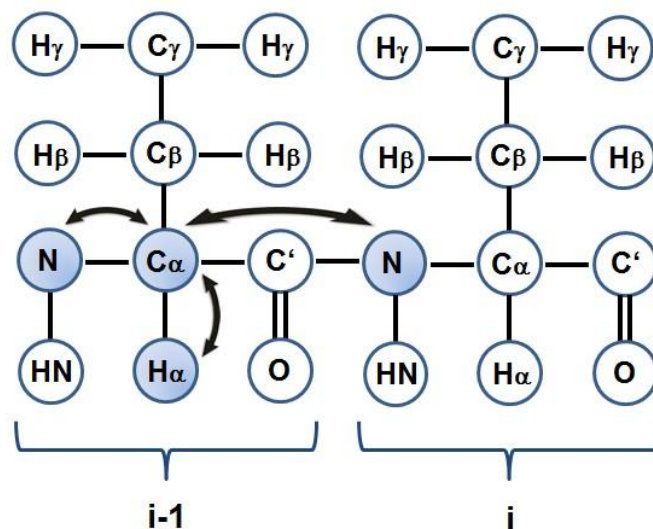


Abbildung 3.11: Magnetisierungstransfer-Schema des 3D HCAN Experimentes

Es wurde das Pulsprogramm **hcanp3d** (*3D sequence with inverse correlation for triple resonance using multiple inept transfer steps, on/off resonance C_α and $\text{C}=\text{O}$ pulses using shaped pulse, phase sensitive (t1), phase sensitive using Echo/Antiecho gradient selection (t2), using constant time in t2*) [71-72] verwendet.

spectral width (SWH) ^1H = 9.6 kHz, ^{15}N = 2 kHz, ^{13}C = 6.4 kHz; *size of fid* (TD) ^1H = 2 K, ^{15}N = 128, ^{13}C = 64; *acquisition time* ^1H = 0.106 s, ^{15}N = 0.016 s, ^{13}C = 0.010 s; *90° hard pulse length* ^1H = 12.4 μs , ^{15}N = 40 μs , *shaped pulse length* ^{13}C = 400 μs ; *relaxation delay* (D1) = 1 s;

Vor der Fourier-Transformation wurden die FIDs in den indirekten Dimensionen (^{15}N und ^{13}C) mit einer um 90° verschobenen quadratischen Sinusfunktion multipliziert (QSINE, SSB = 2). In der direkten Dimension (^1H) wurde eine Lorentz-zu-Gauß-Transformation angewandt, um die Auflösung zu erhöhen. (Linienverbreiterung (LB) ^1H = -6 Hz, ^{15}N und ^{13}C = -8; max. Wert der Gaussverbreiterung (GB) ^1H = 0.12). Die Eichung der Spektren erfolgte nach dem DSS-Signal, welches auf 0 ppm gesetzt wurde.

3.2.3 Diffusions- ^1H -Spektroskopie

CanA neigt sehr leicht zu größeren Aggregaten bzw. sogar zum Teil zur Eigenpolymerisierung (auch trotz Abwesenheit von zweiwertigen Kationen). Größere Proteinaggregate führen wieder zu einer deutlichen Linienverbreiterung. Zur Definierung des nativen Zustandes von CanA bzw. um Informationen über dessen hydrodynamischen Radius und somit seine Größe zu bekommen, wurden diesbezüglich 1D- ^1H -NMR-Diffusionsmessungen durchgeführt. Durch die zusätzliche Zugabe von EDTA sollten zweiwertige Kationen - insbesondere Ca^{2+} und Mg^{2+} - komplexiert und somit maskiert werden. Um eine detailliertere Protein-Charakteristika zu erhalten wurden diverse Messungen bei unterschiedlichen Bedingungen (pH-Variation, unterschiedliche Reinigungsschritte) vorgenommen.

3.2.3.1 Probenvorbereitung für die Diffusionsmessungen

Die Messproben enthielten eine Proteinkonzentration von 0.5 - 1 mM, 10 mM Phosphatpuffer (pH 6.6 bzw. 9), 10% bzw. 100% D_2O und 0.4 mM DSS.

3.2.3.2 Durchführung der Diffusionsmessungen

Für die Messungen wurden die Pulsprogramme **stebpgp1s191d** und **diffuledcsdd2o.wk** verwendet. Die Anzahl der Scans variierte je nach Proteinkonzentration zwischen 32 und 64 Scans. Ebenso wurden die Gradientenpulse angepasst (1 - 3 ms) um den Signalabfall bei einem 100% - Gradient auf ein Niveau von ca. 10 - 15% des ursprünglichen 2% - Gradienten zu bekommen. Die Messungen fanden in 5% Gradient-Schritten von 5% bis 90% statt, wobei eine zusätzliche Messung mit einem Gradienten von 2% gemessen wurde. Die Messungen wurden bei einer Temperatur von 318 K durchgeführt.

3.2.3.3 Auswertung der Diffusionsmessungen

Die aufgenommenen Daten wurden mit TopSpin prozessiert (WDW = EM; LB = 2 Hz) und bearbeitet. Der signifikante, ausgewertete Bereich umfasste 0 - 2 ppm mit DSS als Referenz. Die erhaltenen Daten wurden anschließend mit MS-Excel und Origin6.0 ausgewertet. Der Signalabfall von CanA wurde gegen den angelegten Gradienten aufgetragen und über folgende Formeln wie bei Munte et al [44] beschrieben gefittet. Der hydrodynamische Radius R_h nach Stokes-Einstein ergibt sich durch die **Formel 3.7**.

$$R_h = \frac{k \times T}{6 \times \pi \times \eta \times D}$$

Formel 3.7: Stokes-Einstein-Relation zur Berechnung des hydrodynamischen Radius R_h ; D = Diffusionskonstante, k = Boltzmannkonstante, T = Temperatur, η = Viskosität des Lösungsmittels

Nach der Methode von Wilkins et al. [36] lässt sich der theoretische hydrodynamische Radius $R_{h,theor.}$ eines Proteins über die Anzahl der Aminosäuren N wie folgt berechnen (**Formel 3.8**).

$$R_{h,theor.} = A \times N^{\alpha}$$

Formel 3.8: Berechnung des theoretische hydrodynamische Radius $R_{h,theor.}$ eines Proteins nach Wilkins et al. [36], N = Anzahl der Aminosäuren, $A = 4.75 \pm 1.11$ bzw. 2.21 ± 1.07 , $\alpha = 0.29 \pm 0.02$ bzw. 0.57 ± 0.02 für kompakt gefaltete bzw. komplett denaturierte Proteine

Durch das Vorhandensein zweier Komponenten mit verschiedenem hydrodynamischen Radius und Diffusionskonstante, gemessen bei gleicher Temperatur im gleichen Lösungsmittel, lässt sich die **Formel 3.9** herleiten

$$R_{h,1} = R_{h,2} \times \frac{D_2}{D_1}$$

Formel 3.9: Relation des hydrodynamischen Radius zweier Komponenten; $R_{h,1}$ = hydrodynamischen Radius der Komponente 1, $R_{h,2}$ = hydrodynamischen Radius der Komponente 2, D_1 = Diffusionskonstante der Komponente 1, D_2 = Diffusionskonstante der Komponente 2

Für die Auswertung der Diffusionsmessungen wurde der hydrodynamische Radius $R_{h,2}$ von DSS mit 0.346 nm aus der Masterarbeit von C. Wierschem herangezogen [88].

Durch die Relation der molekularen Masse und der Diffusionskoeffizienten zweier Komponenten gemessen unter gleichen Rahmenbedingungen ergibt sich die **Formel 3.10**.

$$M_1 = M_2 \times \left(\frac{D_2}{D_1} \right)^3$$

Formel 3.10: Relation der molekularen Masse zweier Komponenten über die Diffusionskoeffizienten; M_1 = molekulare Masse Komponente 1, M_2 = molekulare Masse Komponente 2, D_1 = Diffusionskonstante der Komponente 1, D_2 = Diffusionskonstante der Komponente 2

Der Diffusionskoeffizient einer Komponente kann experimentell durch die von den Gradienten abhängigen Signalintensitäten der Komponente in der NMR bestimmt werden [35] (**Formel 3.11**).

$$I_G = I_0 \times e^{-c \times D \times G^2}$$

Formel 3.11: Abhängigkeit der Signalintensität einer Komponente vom Gradientenfeld; I_G = Signalintensität der Komponente bei angelegtem Gradientenfeld, I_0 = Ausgangssignalintensität der Komponente ohne Gradientenfeld, D = Diffusionskonstante der Komponente, G = Stärke des Gradientenfeldes, c = Konstante, Fitparameter für Origin

3.2.4 K₁-CanA und CanA Titrationsen mit Ca²⁺ und Mg²⁺ über (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-Spektroskopie

3.2.4.1 Probenvorbereitung für die Titrationsen

Die Proteinkonzentration der CanA-Titrationsproben betrug 0.12 mM, die der K₁-CanA-Titrationsproben 0.17 mM.

Die Proben hatten folgende Zusammensetzung:

50 mM TRIS/HCL pH 6.6, 80 mM NaCl, 10% D₂O und 0.4 mM DSS als Standard.

Für ein möglichst kleines Titrationsvolumen wurden für CaCl₂ und MgCl₂ Stocklösungen mit unterschiedlichen Konzentrationen hergestellt (0.05 M, 0.5 M, 2.5 M).

3.2.4.2 Durchführung der Titrationsmessungen

Die (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQC-NMR-Spektren wurden an einem Bruker Avance 800 MHz Spektrometer mit 5 mm TCI-Cryoprobe bei 323 K nach Schanda [15, 16] durchgeführt. Zum Titrationsverlauf wurden hierfür (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQCs (sofast.pr) und zu einzelnen Quantifizierungen zusätzlich (¹H-¹⁵N)-TROSYs (trosyf3gppsi19) verwendet. Die ¹H-Resonanzfrequenz betrug hierbei 800.20 MHz, die ¹⁵N-Resonanzfrequenz 81.08 MHz. Die sofast-Spektren wurden als Datenmatrix von

2048 x 256 Punkten mit jeweils 8 Scans für jedes Inkrement aufgenommen. In der ^1H -Dimension betrug die spektrale Breite 11161 Hz ($O_1 = 3767 \text{ Hz}$) und in der ^{15}N -Dimension 3244 Hz ($O_3 = 9527 \text{ Hz}$). Die Relaxationszeit wurde auf 1.5 s gesetzt. Für die Referenzierung wurde DSS verwendet, wobei für die chemischen Verschiebungen von ^1H direkt und die von ^{15}N indirekt die Methode von Wishart [14] verwendet wurde.

Den Messproben wurde von 0.1 mM bis 25.6 mM die jeweilige Salzstocklösung in Titrationsschritten mit Konzentrationsverdopplungen zugeführt.

3.2.4.3 Bestimmung der Bindungsstellen im Protein

Zur Identifizierung der Bindungsstellen von K_1 -CanA und CanA wurden zuerst die Signale der jeweiligen Endspektren (Sättigung der Bindungsstellen) mit den höchsten $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ Konzentrationen über manuelles Peakpicking im Programm Auremol den Signalen der Anfangsspektren der jeweiligen Titration zugeordnet. Die erhaltenen Peakdaten wurden anschließend als Textdokument aus Auremol exportiert und in Excel konvertiert. Die berechneten, kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta_{\text{combined}}$ (**Formel 3.12**) wurden anschließend gegen die Positionen der Aminosäuren aufgetragen.

$$\Delta\delta_{\text{combined}} = \sqrt{\frac{(w_H \times \Delta\delta_H)^2 + (w_N \times \Delta\delta_N)^2}{2}}$$

Formel 3.12: w_H und w_N = Wichtungsfaktor von ^1H bzw. ^{15}N , $\Delta\delta_H$ und $\Delta\delta_N$ = Änderungen der chemischen Verschiebungen von ^1H bzw. ^{15}N , 2 = Anzahl der gewichteten Atomtypen

Die relevanten Aminosäuren wurden hierbei nach Schumann [13] ermittelt. Hierbei muss $\Delta\delta_{\text{combined}}$ signifikant größer sein als die korrigierte Standardabweichung zu Null (σ_0^{corr}).

3.2.4.4 Bestimmung der Bindungskonstanten

Die jeweiligen chemischen Verschiebungen von ^{15}N bzw. ^1H der relevanten Aminosäuren wurden im Programm Origin gegen die Ligandenkonzentration $[L]$ aufgetragen. Für die Berechnung der Bindungskonstante K_D bei schnellem Austausch in Abhängigkeit von der Konzentration des freien, ungebundenen Proteins c_m , der Konzentration des freien, ungebundenen Liganden c_x und der Konzentration des Protein-Liganden-Komplexes c_{mx} wurde folgende Gleichung herangezogen (**Formel 3.13:**).

$$K_D = \frac{c_m \times c_x}{c_{mx}}$$

Formel 3.13: Definition der Bindungskonstanten K_D mit c_m = Konzentration des freien Proteins, c_x = Konzentration des freien Liganden und c_{mx} = Konzentration des Protein-Liganden-Komplexes

Die chemische Verschiebung δ jedes einzelnen Signals steht zu den verschiedenen Konzentrationen in folgendem Verhältnis (**Formel 3.14**)

$$\delta = \delta_m \times \frac{c_m}{c_m^{total}} + \delta_{mx} \times \frac{c_{mx}}{c_m^{total}}$$

Formel 3.14: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung δ eines Signals. δ_m = chemische Verschiebung des freien Proteins, δ_{mx} = chemische Verschiebung des Protein-Liganden-Komplexes, c_m = Konzentration des freien Proteins, c_{mx} = Konzentration des Protein-Liganden-Komplexes, c_m^{total} = Gesamtkonzentration des freien und gebundenen Proteins

Durch die Kombination der **Formel 3.13** mit **Formel 3.14** nach Schumann [13] erhält man die **Formel 3.15**, welche eine direkte Abhängigkeit der chemischen Verschiebung δ eines Signals mit der Bindungskonstante K_D herstellt.

$$\delta - \delta_m = (\delta_{mx} - \delta_m) \times \frac{(c_m^{total} + c_x^{total} + K_D) - \sqrt{(c_m^{total} + c_x^{total} + K_D)^2 - (4 \times c_m^{total} \times c_x^{total})}}{2 \times c_m^{total}}$$

Formel 3.15: Abhängigkeit der chemischen Verschiebung δ eines Signals von der Bindungskonstante K_D . δ_m = chemische Verschiebung des freien Proteins, δ_{mx} = chemische Verschiebung des Protein-Liganden-Komplexes, c_m^{total} = Gesamtkonzentration des freien und gebundenen Proteins, c_x^{total} = Gesamtkonzentration des freien und gebundenen Liganden, K_D = Bindungskonstante

Anhand der gewonnenen chemischen Verschiebungen, hervorgerufen durch die Zutitrierung von Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} mit ansteigender Konzentration zu K₁-CanA bzw. CanA, konnte die Bindungskonstante K_D durch die Fittung mit der **Formel 3.15** im Programm Origin bestimmt werden.

Die Bindungskonstanten K_D der jeweiligen Bindungszentren wurden arithmetisch gemittelt und der K_D - Varianzbereich mittels einem zweiseitigen **t-Test (Formel 3.16)** - Konfidenzintervall $P = 95\%$ und $n - 1$ Freiheitsgraden f [90] - bestimmt. Die benötigte Standardabweichung wurde mit **Formel 3.17** berechnet.

$$\Delta x = t_{95} \times \frac{1}{\sqrt{n}} \times s$$

Formel 3.16: K_D - Varianzbereich Δx des zweiseitigen **t-Test** mit $P = 95\%$ und $f = n - 1$, s = Standardabweichung, n = Anzahl der K_D Werte [90]

$$s = \sqrt{\frac{1}{N-1} \sum_{j=1}^N (v_j - \bar{v})^2}$$

Formel 3.17: Standardabweichung: v_j = mit zufälligen Fehlern behaftete Werte mit $j = 1 \dots N$; N = Anzahl der Messwerte, \bar{v} = arithmetischer Mittelwert

3.2.5 Die cis- / trans- Konformation bei Prolinen

Der Bindungswinkel ω bei planaren Peptidbindungen kann die Werte 0° (für eine cis-Konformation) bzw. 180° (für eine trans-Konformation) annehmen. Durch die starke sterische Hinderung der Seitenketten, die bei cis-Konformationen auftritt, befinden sich Peptidbindungen in der Regel in der trans-Konformation. Eine Ausnahme bilden hierbei die Peptidbindungen der Proline, deren zyklischer Ringschluss eine mindere sterische Hinderung aufweist. Hierdurch ist auch eine cis-Konformation der Peptidbindung möglich. Es kommt nicht selten zu einer cis-trans-Isomerie, welche in der NMR-Spektroskopie in einer Signalaufspaltung (falls beide Zustände zur gleichen Zeit vorliegen und diese sich nicht im schnellen Austausch befinden) zu beobachten ist.

Zur Identifikation der Isomerie der Proline wurden zwei Verfahren durchgeführt.

Die cis-Konformation bei Prolinen hat eine Änderung der chemischen Verschiebung der $^{13}\text{C}^\gamma$ Signale in den Hochfeld- und der $^{13}\text{C}^\beta$ Signale in den Tieffeld-Bereich zur Folge (**Tabelle 3.3**) [89].

		$^{13}\text{C}^\beta$ Pro trans	$^{13}\text{C}^\beta$ Pro cis	$^{13}\text{C}^\gamma$ Pro trans	$^{13}\text{C}^\gamma$ Pro cis
Mittelwert δ	[ppm]	31.75	34.16	27.26	24.52
Minimalwert δ_{\min}	[ppm]	26.30	30.74	19.31	22.10
Maximalwert δ_{\max}	[ppm]	35.83	36.23	33.39	27.01
Standardabweichung σ_δ	[ppm]	0.98	1.15	1.05	1.09

Tabelle 3.3: Überblick über die statistischen Werte der chemischen Verschiebungen von $^{13}\text{C}^\beta$ und $^{13}\text{C}^\gamma$ von 1033 Prolinen mit cis- bzw. trans-Konformation

Die Differenz $\Delta_{\beta\gamma}$ der chemischen Verschiebungen kann somit als Indikator für eine cis-trans-Konformation herangezogen werden (**Formel 3.18**) [84].

$$\Delta_{\beta\gamma} = \delta[^{13}\text{C}^{\beta}] - \delta[^{13}\text{C}^{\gamma}]$$

Formel 3.18: Formel für die Berechnung der chemischen Verschiebungsdifferenz: $\Delta_{\beta\gamma}$ = chemische Verschiebungsdifferenz; $\delta[^{13}\text{C}^{\beta}]$ = chemische Verschiebung von $^{13}\text{C}^{\beta}$; $\delta[^{13}\text{C}^{\gamma}]$ = chemische Verschiebung von $^{13}\text{C}^{\gamma}$

Die chemische Verschiebungsdifferenz $\Delta_{\beta\gamma}$ liefert somit einen festen Zahlenwert der mit weiteren chemischen Verschiebungsdifferenz Werten von Prolinen mit bekannter Konformation aus Strukturdatenbanken verglichen werden kann. Die **Tabelle 3.4** gibt die statistische Verteilung der Änderung der chemischen Verschiebungsdifferenz $\Delta_{\beta\gamma}$ von 1033 Prolinen wieder. [85]

		$\Delta_{\beta\gamma}$ Pro trans	$\Delta_{\beta\gamma}$ Pro cis
Mittelwert Δ	[ppm]	4.51	9.64
Variance σ^2_{Δ}	[ppm²]	1.37	1.62
Standardabweichung σ_{Δ}	[ppm]	1.17	1.27

Tabelle 3.4: Statistische Werte der chemischen Verschiebungsdifferenz $\Delta_{\beta\gamma}$ zur Bestimmung der Peptidbindungskonformation bei Prolinen

Bei dem zweiten Verfahren werden die NOE-Kontakte zwischen Prolin und der vorangegangenen Aminosäure X zur Unterscheidung zwischen einer cis-/trans X-Prolin-Peptidbindung herangezogen [86-87].

Eine **trans X-Prolin**-Peptidbindung zeigt hierbei starke NOEs zwischen $\text{H}^{\delta}_{(\text{Pro})}$ und $\text{H}^{\alpha}_{(\text{X})}$ und zusätzlich zwischen $\text{H}^{\delta}_{(\text{Pro})}$ und $\text{H}^{\text{N}}_{(\text{X})}$.

Eine **cis X-Prolin**-Peptidbindung zeigt hingegen starke NOEs zwischen $\text{H}^{\alpha}_{(\text{Pro})}$ und $\text{H}^{\alpha}_{(\text{X})}$ und zusätzlich zwischen $\text{H}^{\alpha}_{(\text{Pro})}$ und $\text{H}^{\text{N}}_{(\text{X})}$.

4.2 Expression und Reinigung

Die im Methodenteil beschriebene Expression und Reinigung von unmarkiertem CanA nach den Arbeiten von Katrin Singer und Bianca Mai wurde in dieser Arbeit zur Erhöhung des Reinheitsgrades und der Ausbeute weiter modifiziert und somit optimiert.

4.2.1 Optimierungen der Expression und der Reinigung von CanA und seinen Konstrukten

Wegen der hohen Affinität von CanA und K₁-CanA gegenüber Ca²⁺ und Mg²⁺ wurde anstatt wie bei Bianca Mai und Katrin Singer beschrieben, kein Zellaufschluss mit Lysozym, sondern ein nativer Aufschluss mit Ultraschall durchgeführt. Ein Vergleich von NMR Versuchen mit Proben nach einem Ultraschall- bzw. Lysozym-Aufschluss zeigten eine sehr leichte Linienverbreiterung, wahrscheinlich durch das beim Lysozym-Aufschluss verwendete MgCl₂. Deswegen wurde im weiteren Verlauf der Arbeit der Zellaufschluss ausschließlich mit Ultraschall durchgeführt.

Die höchste Ausbeute des Hitzeschrittes bei einem möglichst hohen Reinheitsgrad erzielte eine 10 min Behandlung bei 90 °C. Je höher die Temperatur und die Verweildauer desto höher ist der Reinheitsgrad und desto niedriger ist die quantitative Ausbeute. Die **Abbildung 4.2** zeigt den sehr hohen Reinheitsgrad des Proteins bei sehr geringem Denaturierungsverlust nach dem Hitzeschritt im Vergleich zum Aufschluss.

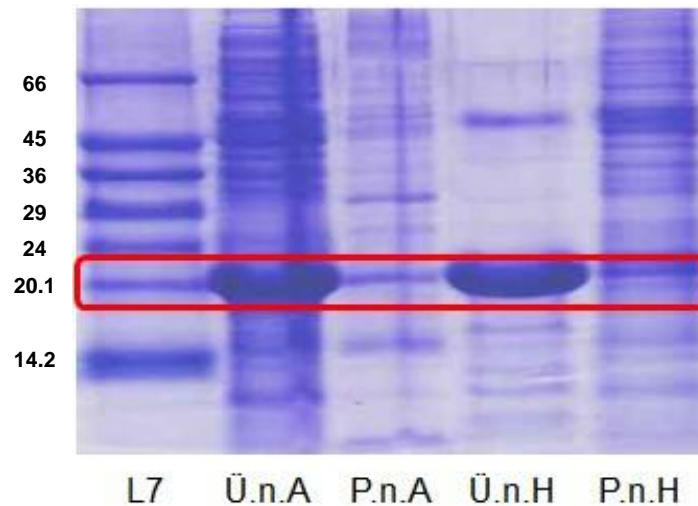


Abbildung 4.2: SDS-Gel eines bei 90 °C behandelten CanA Expressionsansatzes, L7 = Dalton Mark VII – Proteinlaufstandard, Ü.n.A = Überstand nach dem Aufschluss, P.n.A = Pellet nach dem Aufschluss, Ü.n.H = Überstand nach dem Hitzeschritt, P.n.H = Pellet nach dem Hitzeschritt; **CanA** wurde rot markiert

Bei der Anionenaustauschchromatographie über eine Q-Sepharose-Säule (HiLoad 26/10 Fast Flow) mit ausreichender Proteinbindungskapazität und einem NaCl-Gradienten (Chromatographiepuffer I: 50 mM TRIS/HCl pH = 7.4; Chromatographiepuffer II: 50 mM TRIS/HCl pH = 7.4; 500 mM NaCl), wurde CanA und K₁-CanA ausschließlich ab einer Salzkonzentration von ca. 150 mM NaCl und einem Elutionsvolumen von 650 mL bis 1050 mL von der Säule eluiert. Der Elutionsverlauf von CanA und K₁-CanA wurde über IR verfolgt und durch SDS-PAGE verifiziert (**Abbildung 4.3**).

Die anschließende Gelfiltration der vereinigten und konzentrierten CanA Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie führten zu einem sehr hohen Reinheitsgrad des Proteins (**Abbildung 4.4**)

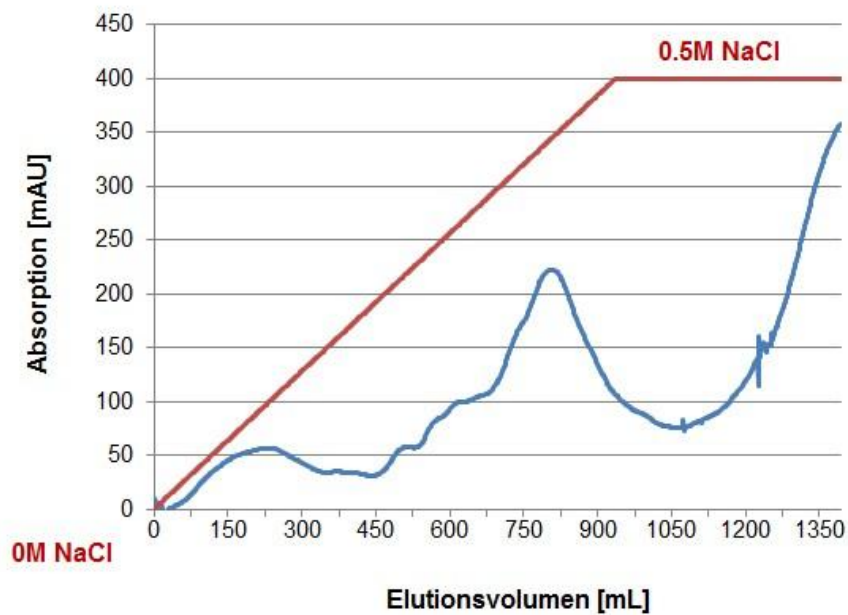


Abbildung 4.3: IR-Elutionsverlauf (blau) der Anionenaustauschchromatographie von CanA über eine Q-Sepharose-Säule mit einem Salzgradienten von 0 bis 0.5 M NaCl (rot). CanA wurde hierbei ab einer errechneten Salzkonzentration von 150 mM NaCl (hier zu sehen von 600 bis 1050 mL) eluiert.

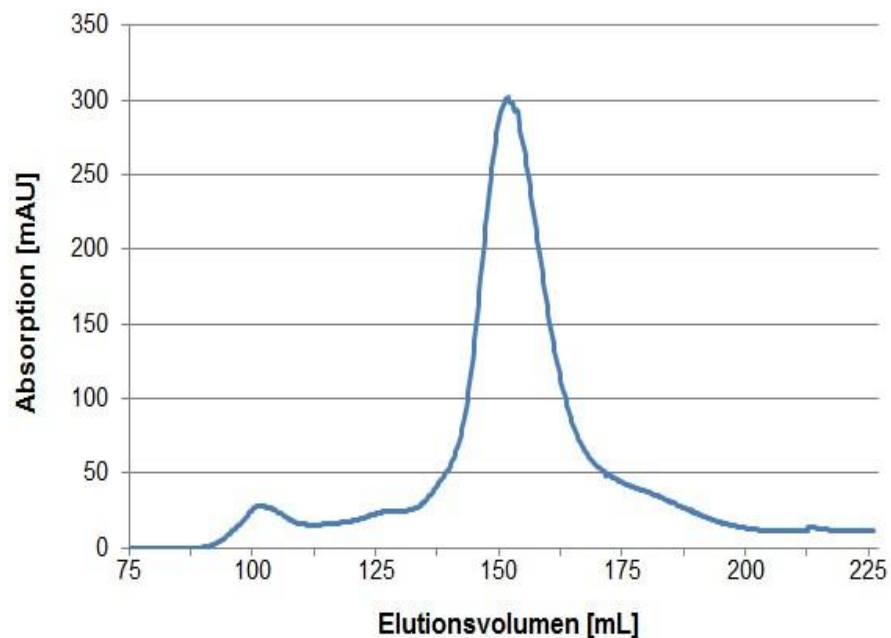


Abbildung 4.4: Gelfiltration der vereinigten und konzentrierten CanA Fraktionen der Ionenaustauschchromatographie

Zusätzlich zu den erwarteten Proteinfractionen wurde bei der Ionenaustauschchromatographie eine thermophile unbekannte Proteinfraction detektiert (**Abbildung 4.3** ab 1050 mL bis 1395 mL), welche erst bei sehr hoher NaCl Konzentration von der Säule eluierte. Zur Klassifizierung wurde das unbekannte Protein isoliert, ansequenziert und über TEM vermessen.

Die auf Edmann-Abbau basierte Sequenzierung brachte hervor, dass das Protein keine einheitliche N-terminale Aminosäuresequenz zu haben scheint. Ebenso die TEM Messungen zeigten eine unstrukturierte amorphe Oligomerstruktur (**Abbildung 4.31**).

Aufgrund dieser Befunde wurde ein erneuter Expressionsansatz der verwendeten Glycerinkulturen hergestellt. Die Expression der Proteine wurde jedoch nicht mit IPTG induziert, sondern nur das reine Bakterienwachstum gefördert. Nach den ursprünglichen Reinigungsschritten laut Protokoll wurde eine Ionenaustauschchromatographie durchgeführt um festzustellen, ob die Menge der unbekannten Proteinfraction sich in Abhängigkeit der Konzentration von Protein CanA befindet. Bei der Ionenaustauschchromatographie wurde ein NaCl-Gradient von 0 bis 1.5 M angewandt um die unbekannte Proteinfraction vollständig von der Säule zu spülen. Wie in der **Abbildung 4.5** zu sehen ist, tritt die unbekannte Proteinfraction trotz der geringen Eigenexpression von CanA ohne IPTG Zugabe bei *E. coli* Bakterien verstärkt auf.

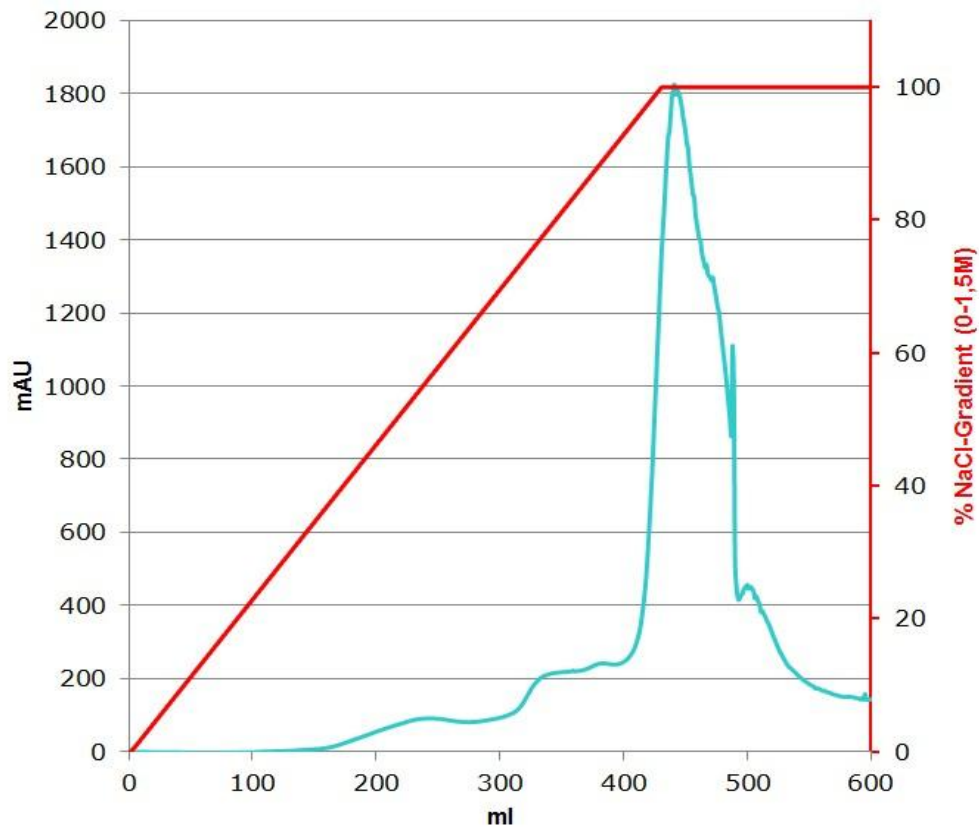


Abbildung 4.5: Ionenaustauschchromatogramm eines nicht IPTG induzierten Expressionsansatzes von *E. coli* BL21(DE3)-CanA

Eine Reihe von Miniatur-Expressions-Ansätzen zur Ermittlung des besten Minimalmediums für die ^{13}C / ^{15}N Isotopen-Labelung von CanA und K₁-CanA ergab eine leicht erhöhte Expressionsrate für CanA in Neidhardt-Minimalmedium und eine leicht erhöhte Expressionsrate für K₁-CanA in Neuem Minimalmedium (NMM) (siehe **Kapitel 2.4.1**).

Der Vergleichsfaktor der Ausbeuten bei Gebrauch von optimierten Minimalmedien mit 2 g ^{13}C -Glucose und 1 g $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ gegenüber Minimalmedien mit 10 g Glucose und 1 g $^{15}\text{NH}_4\text{Cl}$ bzw. reinem LB₀-Vollmedium beträgt 1 : 2 : 4

4.3 Polymerisierung von CanA und K₁-CanA

Wie in **Kapitel 3.1.7** beschrieben, wurde der Polymerisierungsverlauf von CanA bzw. K₁-CanA NMR-spektroskopisch dokumentiert. Hierfür wurde jeweils eine Probe mit 10 mg lyophilisierten Protein in 0.52 mL TRIS Puffer (50 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH = 7.5), 50 μ L D₂O, 2 μ L DSS (0.1 M)) in ein NMR-Tube überführt. Die Polymerisation wurde mit 10 μ L einer 1 M MgCl₂/CaCl₂-Stammlösung (entspricht 20 mM Mg²⁺ bzw. Ca²⁺ im NMR-Tube) induziert und die Polymerisation bei 298 K mit ¹H-Spektren über einen Zeitraum von 42 h detektiert.

Die gezeigten CanA-Spektren des Polymerisierungsverlaufs in **Abbildung 4.6** beinhalten der Übersicht halber nur eine Auswahl der zu Beginn durchgeführten Messungen. Für die Dokumentation des Polymerisierungsverlaufs wurden die ersten 100 Experimente mit einem Messintervall von je 3.5 min und anschließend 72 Experimente mit einem Messintervall von je 30 min durchgeführt. Wodurch sich eine Gesamtaufnahmezeit von über 42h ergibt.

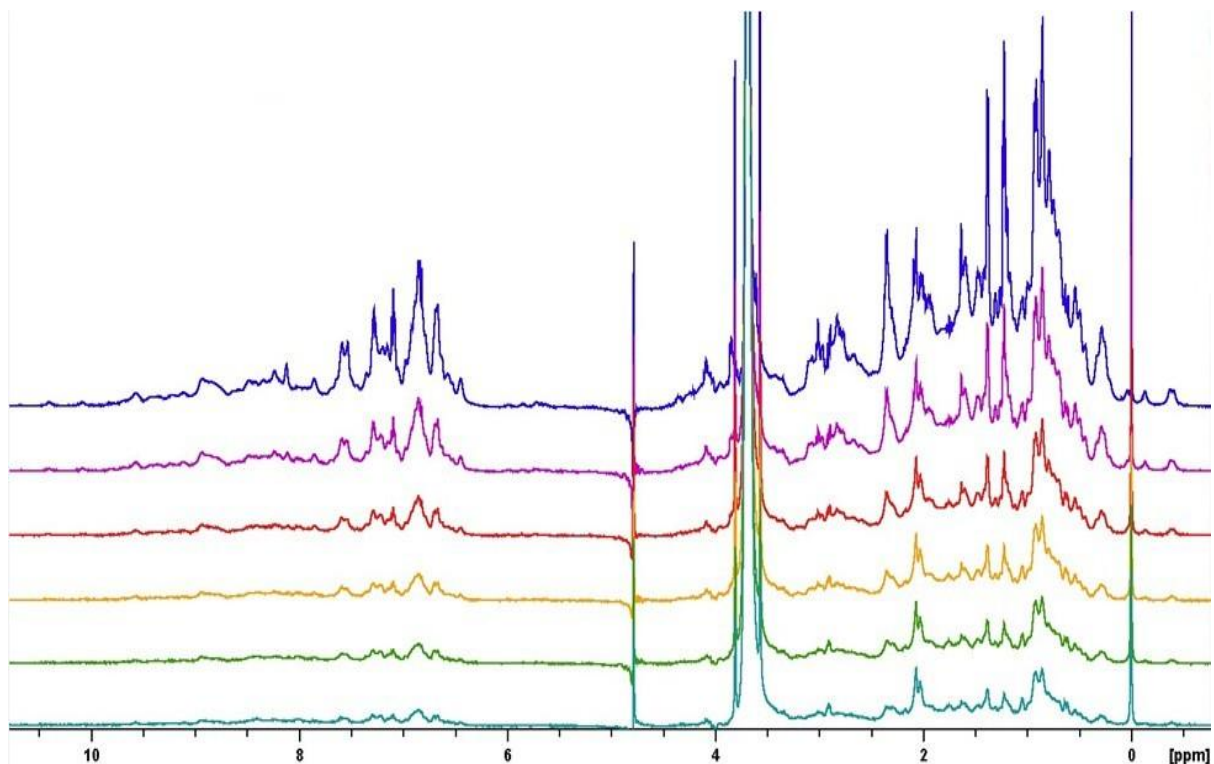


Abbildung 4.6: ¹H-Spektren des Polymerisierungsverlaufs von CanA (von oben nach unten) bei 298 K zu Beginn nach 1 h 12 min, 2 h 24 min, 3 h 36 min, 4 h 48min und 6 h; 10 mg lyophilisiertes CanA in 0.52 mL TRIS Puffer (50 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH = 7.5, 50 μ L D₂O, 2 μ L DSS (0.1 M)), + 20 mM MgCl₂ und 20 mM CaCl₂

Bereits hier wird es deutlich, dass die Polymerisation von CanA trotz der relativ großen Proteinmenge quantitativ über einen kurzen Zeitraum fast vollständig abgeschlossen ist. Der weitere vollständige Polymerisierungsverlauf wurde in **Abbildung 4.7** dargestellt und beinhaltet folgende signifikante Zeitintervalle: nach 0 min, 6 h, 12 h, 24 h, 42 h.

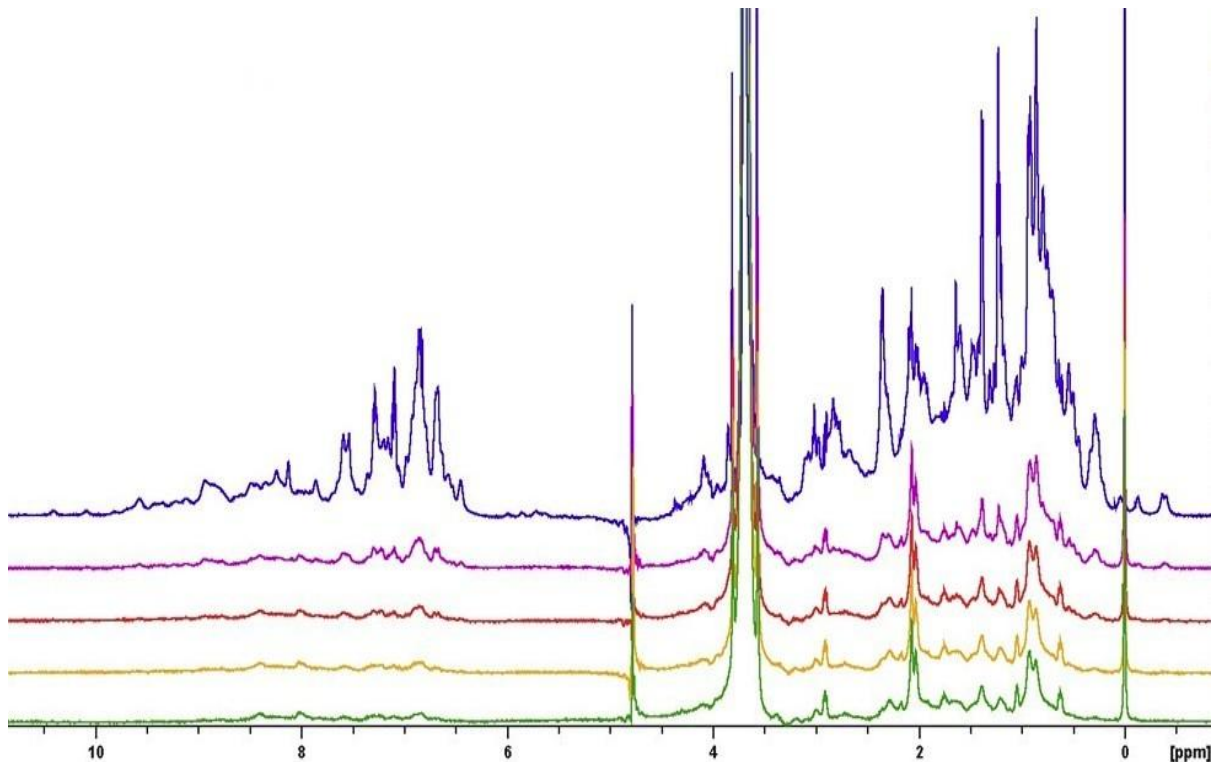


Abbildung 4.7: ^1H -Spektren des Polymerisierungsverlaufs von CanA (von oben nach unten) bei 298 K zu Beginn nach 6h, 12h, 24h und 42 h; 10 mg lyophilisiertes CanA in 0.52 mL TRIS Puffer (50 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH = 7.5, 50 μL D_2O , 2 μL DSS (0.1 M)), + 20 mM MgCl_2 und 20 mM CaCl_2

Die **Abbildung 4.8** gibt den unpolymerisierten Zustand (**blau, oben**) und den vollständigen polymerisierten Zustand von CanA nach 42 h (**rot, unten**) wieder, wobei das Spektrum des Endes der Polymerisation um den Faktor 4 vergrößert dargestellt wurde.

Das nach der Polymerisation resultierende Restspektrum weist bei 0.87 ppm, 0.93 ppm, 2.03 ppm und 2.07 ppm noch relativ starke Signale im Gegensatz zur Signalintensität der restlichen Signale auf. Während der Polymerisation nimmt jedoch

die Intensität der Signale stark ab und eine deutliche Erhöhung der Linienbreite tritt ein. Die Signalintensität im Bereich von 2.03 ppm und 2.07 ppm nimmt ca. um den Faktor 2, die Signalintensität im Bereich von 0.87 ppm und 0.93 ppm ca. um den Faktor 6 und die Signalintensität des größten Teils des restlichen Spektrums ca. um den Faktor 8 ab. Generell kann gesagt werden, dass das Endspektrum nicht dem Ausgangsspektrum mit geringerer Signalintensität und vergrößerter Linienbreite gleicht. Viele der Signale treten nicht mehr auf, es entstehen jedoch auch keine neuen. Die sich kaum verändernde Signalintensität bei 2.03 ppm und 2.07 ppm weist auf einen flexiblen durch die Polymerisation kaum beeinträchtigten Bereich hin.

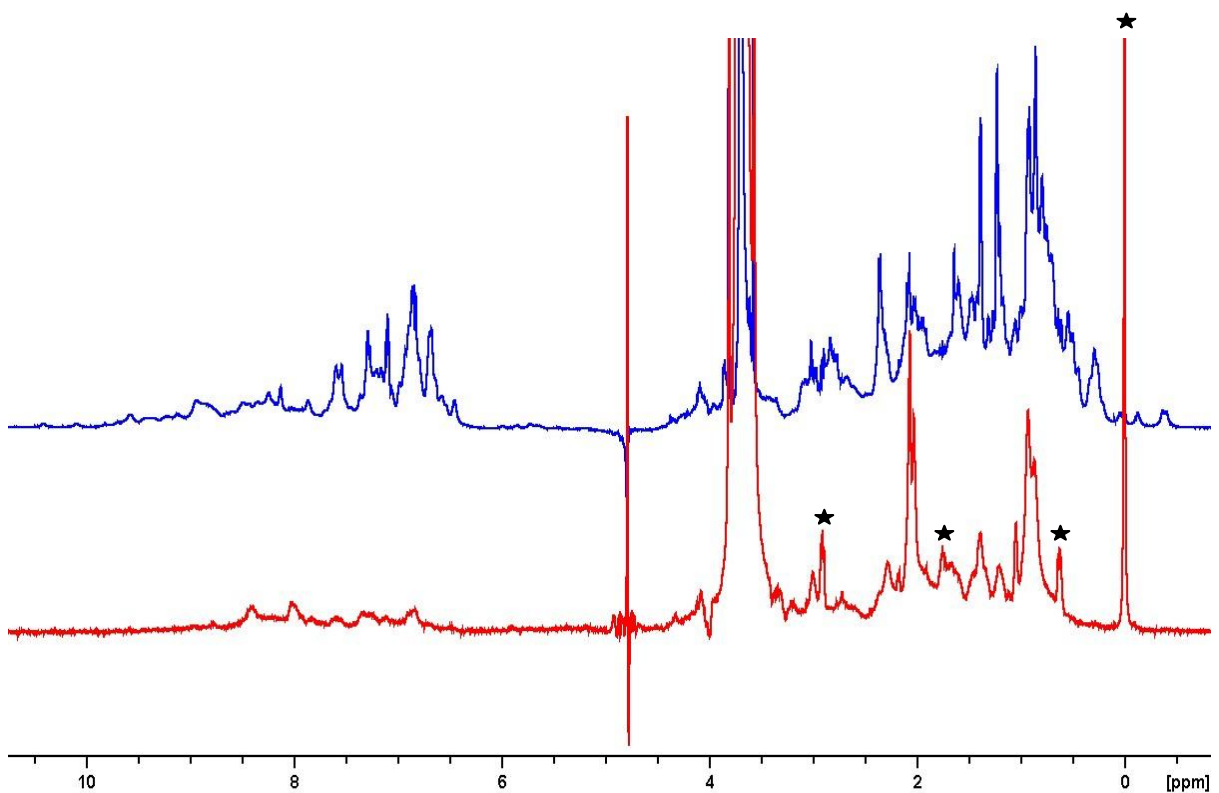


Abbildung 4.8: ^1H -Spektren des Polymerisierungsverlaufs von CanA zu Beginn (blau, oben) und am Ende nach 42 h (rot, unten) der Polymerisation bei 298 K - das Endspektrum wurde um den Faktor 4 vergrößert dargestellt, ★ = Signale von DSS; 10 mg lyophilisiertes CanA in 0.52 mL TRIS Puffer (50 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH = 7.5, 50 μL D_2O , 2 μL DSS (0.1 M)), + 20 mM MgCl_2 und 20 mM CaCl_2

Die NMR Signale bei 0.87 ppm und 0.93 ppm resultieren in der Regel von den frei beweglichen Methylgruppen der Seitenketten von Leucin, Isoleucin und Valin. Die NMR Signale bei 2.03 ppm und 2.07 ppm weisen in der Regel auf die H_β Protonen

der Aminosäuren Prolin, Valin, Glutamin und Glutamat hin, bzw. auf die $(H^{\delta})_3$ Protonen eines Methionins [32, 33]. Bis auf das scharfe Signal der $(H^{\delta})_3$ Protonen von Methionin, weisen alle anderen Aminosäuren von Anfang an breite Signale mit hoher Multiplettaufspaltungen auf.

Die Polymerisierung von CanA zeigte einen exponentiellen Signalabfall, wobei ca. 90% von CanA bereits nach ca. 5.5 h im polymerisierten Zustand vorlag (**Abbildung 4.9**).

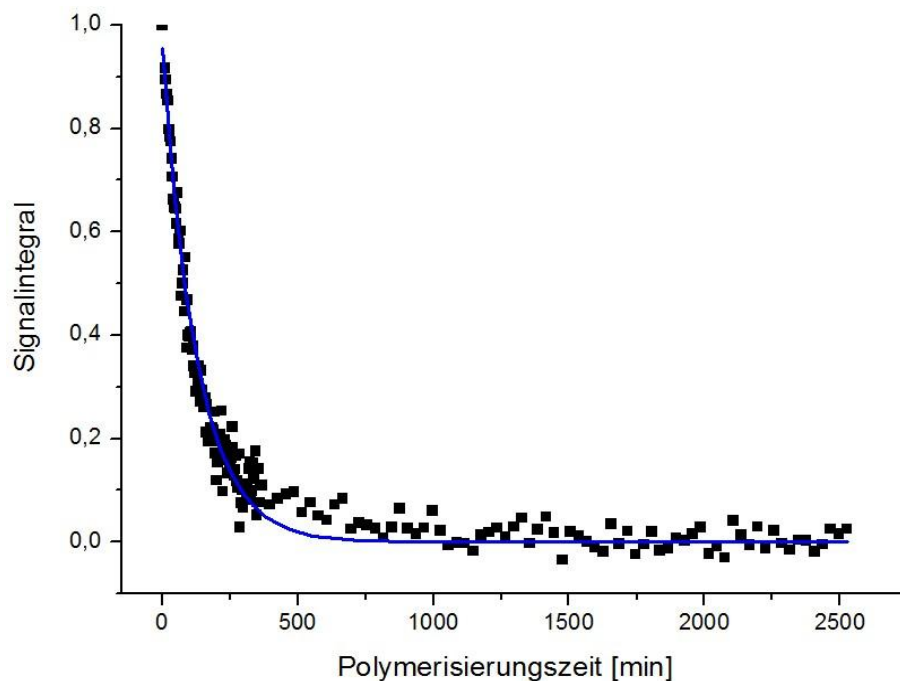


Abbildung 4.9: Diagramm der Polymerisierung von CanA bei 298 K; Integralabnahme der hochfeldverschobenen Methyl Signale (zwischen -0.6 ppm und 0.1 ppm) von CanA, aufgetragen gegen die Polymerisierungszeit; Messintervall von 0 bis 360 min alle 220 s, danach ab 360 min alle 30 min, exponentieller Signalabfall erster Ordnung, Zeitkonstante $t_1 = 7697$ s, 90% Signalabfall bei ca. 5 h; 10 mg lyophilisiertes CanA in 0.52 mL TRIS Puffer (50 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH = 7.5, 50 μ L D_2O , 2 μ L DSS (0.1 M)); die Polymerisation wurde zur Zeit $t = 0$ durch die Zugabe von 20 mM $MgCl_2$ und 20 mM $CaCl_2$ induziert

Eine vollständige Polymerisierung von CanA lag bei ca. 24 h vor. Bei der Auswertung wurde aufgrund der Linienverbreiterung bei der Polymerisation nicht die Signalintensität sondern der Abfall der Signalintegrale über die Zeit aufgetragen.

K₁-CanA hingegen zeigte unter den gleichen Polymerisierungs-Bedingungen wie bei CanA keinerlei Signalabfall über die Polymerisierungsdauer.

Die **Abbildung 4.10** gibt diesen Verlauf zu Beginn der Polymerisation (**blau**) und nach 20 h Polymerisierungsdauer (**rot**) wieder. Beide Spektren sind vollkommen identisch. Die minimalen Abweichungen kommen durch eine leicht unterschiedliche Phasung und Baselinekorrektur bei gleicher Prozessierung zustande.

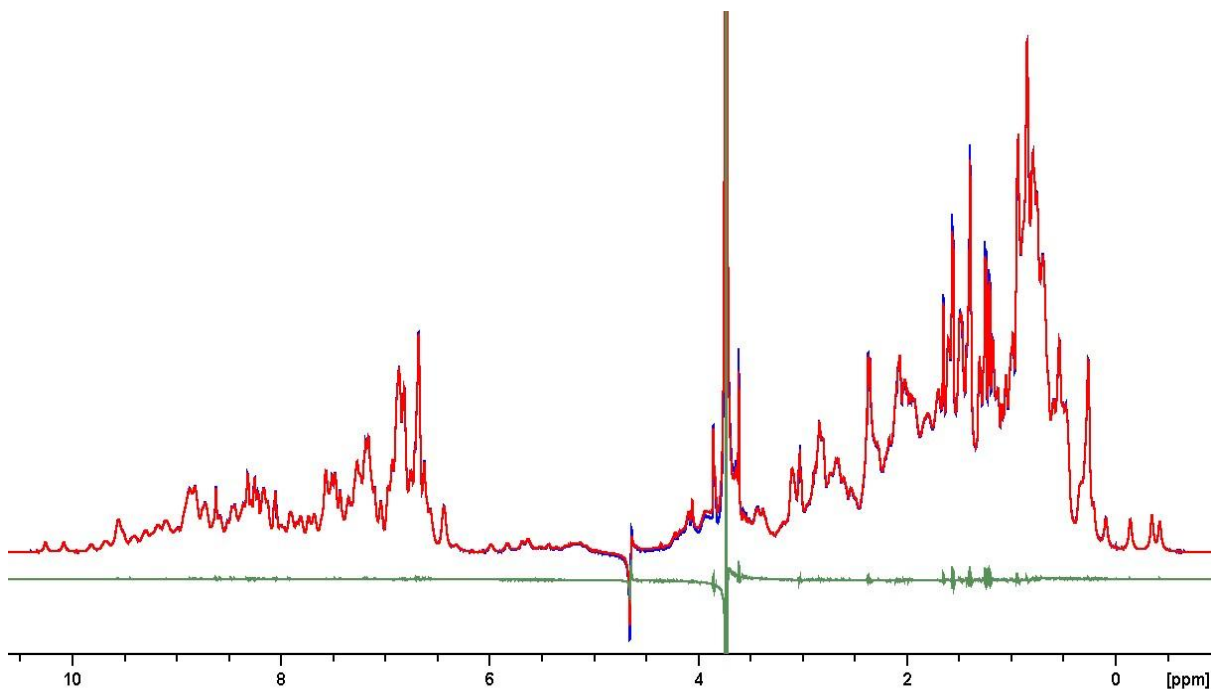


Abbildung 4.10: ¹H-Spektren des Polymerisierungsverlaufs von K₁-CanA zu Beginn (blau) und nach 20 h (rot) bei 298 K; 10 mg lyophilisiertes K₁-CanA in 0.52 mL TRIS Puffer (50 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH = 7.5, 50 µL D₂O), + 20 mM MgCl₂ und 20 mM CaCl₂

Die Auswertung des Experimentverlaufs von K₁-CanA mit dem Abfall der Signalintegrale über die Zeit ist der **Abbildung 4.11** zu entnehmen. Es wurde zur Übersicht hierbei nur der Abfall in jeder Stunde aufgetragen. Die leichten Abweichungen vom Basiswert 1 von bis zu max. ± 0.035 (entsprechen 3.5%) liegen hierbei im Fehlerbereich der Auswertung der Messmethode. Der Fehler entsteht hierbei zum größten Teil durch einen leichten Phasenunterschied der Spektren bei der Prozessierung, sowie einer leichten Differenz in der manuell gesetzten Baselinekorrektur. Ebenso ist hierbei auch der Skalierungsfehler bei der manuellen Normierung zu berücksichtigen.

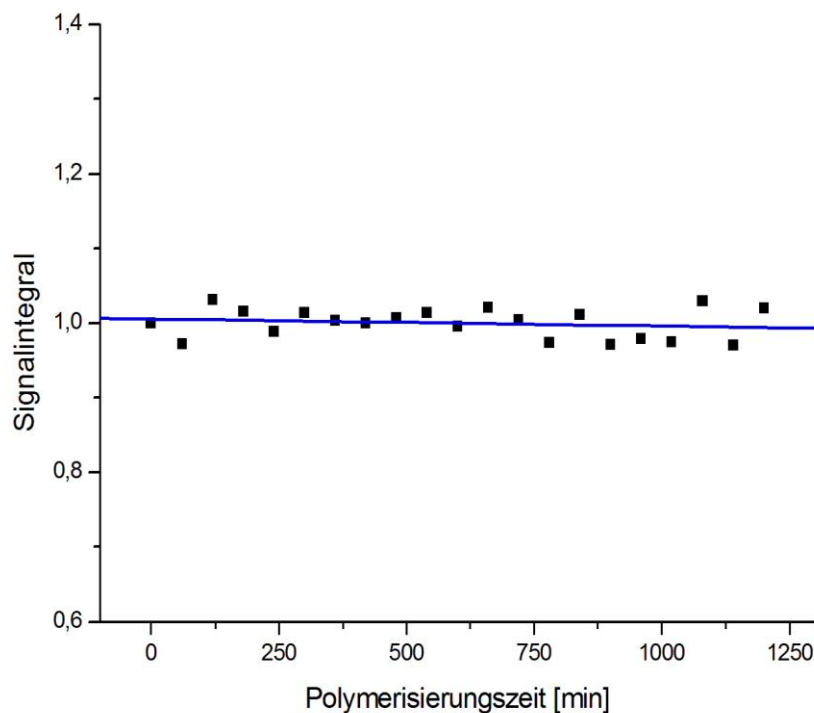


Abbildung 4.11: Diagramm der Polymerisierung von K_1 -CanA; Integralverlauf der hochfeldverschobenen Methyl Signale (zwischen -0.6 ppm und 0.1 ppm) von K_1 -CanA, aufgetragen gegen die Polymerisierungszeit, 10 mg lyophilisiertes K_1 -CanA in 0.52 mL TRIS Puffer (50 mM TRIS, 50 mM NaCl, pH = 7.5, 50 μ L D_2O); zur Zeit $t = 0$ wurde durch die Zugabe von 20 mM $MgCl_2$ und 20 mM $CaCl_2$ versucht die Polymerisation einzuleiten

Im späteren Verlauf dieser Arbeit wurden Titrationsmessungen an ^{15}N markiertem CanA und K_1 -CanA mit $CaCl_2$ Lösungen durchgeführt (siehe **Kapitel 3.2.4** und **4.11**).

Der durch $CaCl_2$ induzierte Polymerisationsverlauf von CanA wurde mit $(^1H-^{15}N)$ -*sofast*-HMQCs verfolgt. Die **Abbildung 4.12** zeigt ein $(^1H-^{15}N)$ -*sofast*-HMQC von CanA ohne $CaCl_2$ **(a)** bzw. ein $(^1H-^{15}N)$ -*sofast*-HMQC des Polymerisierungsgrades von CanA nach ca. 11 h, mit einer $CaCl_2$ -Gesamtkonzentration von 6.4 mM **(b)**. Hierbei wird schnell deutlich, dass eine einheitliche Abnahme aller ^{15}N Signalintensitäten, bis auf die mit den Nummern **1**, **2** und **3** markierten Regionen erfolgt. Die ^{15}N -Signale der Aminosäuren **A24**, **D32**, **A89**, **V99**, **F166**, **V171**, die Aminalene-Seitenketten von **N55**, **N135** und **Q170** sowie ein ^{15}N -Signal welches vermutlich dem **N-Terminus** zuzuordnen ist (**orange**), weisen im Vergleich zu den restlichen ^{15}N -Signalen eine minimal höhere Intensität auf.

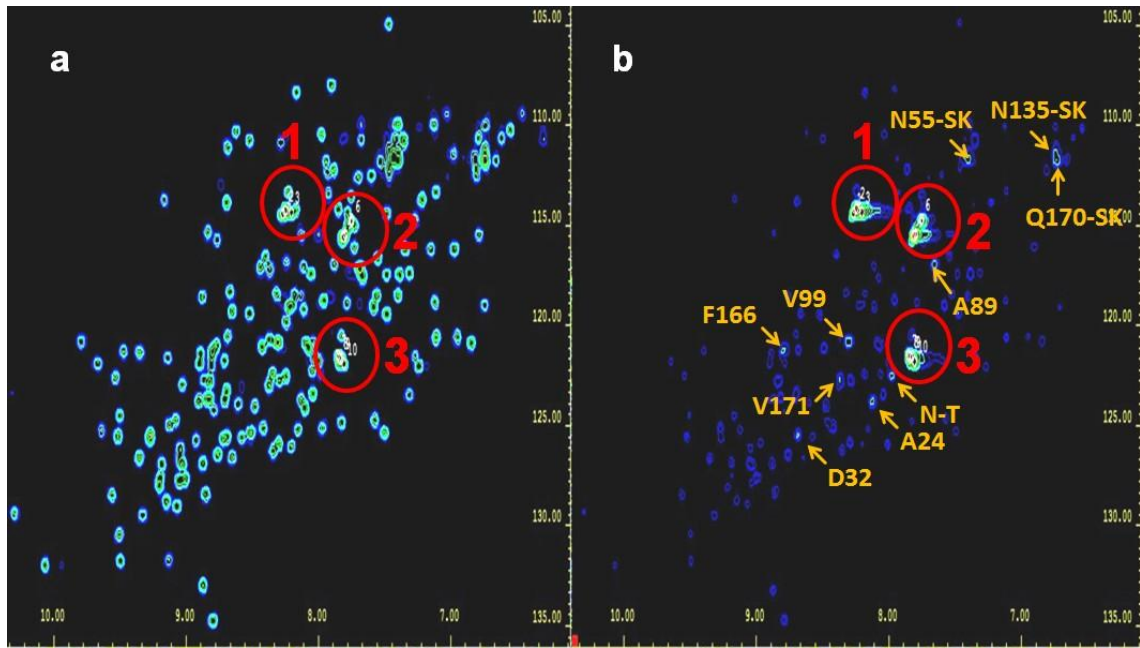


Abbildung 4.12: (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC von CanA ($c = 0.12 \text{ mM}$) ohne **(a)** und mit CaCl_2 ($c(\text{CaCl}_2) = 6.4 \text{ mM}$) nach ca. 11 h **(b)** bei 323 K; 50 mM TRIS/HCl, pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O , 0.4 mM DSS, Spektrometer = 800 MHz; ^{15}N Signale die nicht durch die Polymerisation an Intensität verloren, wurden rot mit den Nummern **1**, **2** und **3** markiert; die ^{15}N -Signale der Aminosäuren **A24**, **D32**, **A89**, **V99**, **F166**, **V171**, die Aminosäuren-Seitenketten von **N55**, **N135**, **Q170**, sowie ein ^{15}N -Signal **N-T** welches vermutlich dem N-Terminus zuzuordnen ist, wurden orange markiert.

Die markierten Regionen der Polymerisation von CanA wurden in **Abbildung 4.13**, **Abbildung 4.14** und **Abbildung 4.15** vergrößert dargestellt und mit den Titrationsspektren von $\text{K}_1\text{-CanA}$, welche unter den gleichen Bedingungen wie bei CanA aufgenommen wurden verglichen. Hierbei wurde sowohl der Ausgangszustand ohne CaCl_2 von CanA **(a)** bzw. $\text{K}_1\text{-CanA}$ **(c)**, als auch der Zustand mit 6.4 mM CaCl_2 nach 11 h von CanA **(b)** bzw. $\text{K}_1\text{-CanA}$ **(d)** dargestellt. Die mit den Großbuchstaben **A**, **B**, **C**, **D**, **E**, **F**, **G**, **H**, **I** und **J** gekennzeichneten Peaks geben hierbei die ^{15}N Signale wieder, deren Signalintensität so gut wie unbeeinflusst bei der Polymerisation von CanA bleibt. Es sei hierbei erwähnt, dass die gekennzeichneten ^{15}N Signale bei der Zuordnung für die Strukturbestimmung keiner Aminosäure eindeutig zugeordnet werden konnten.

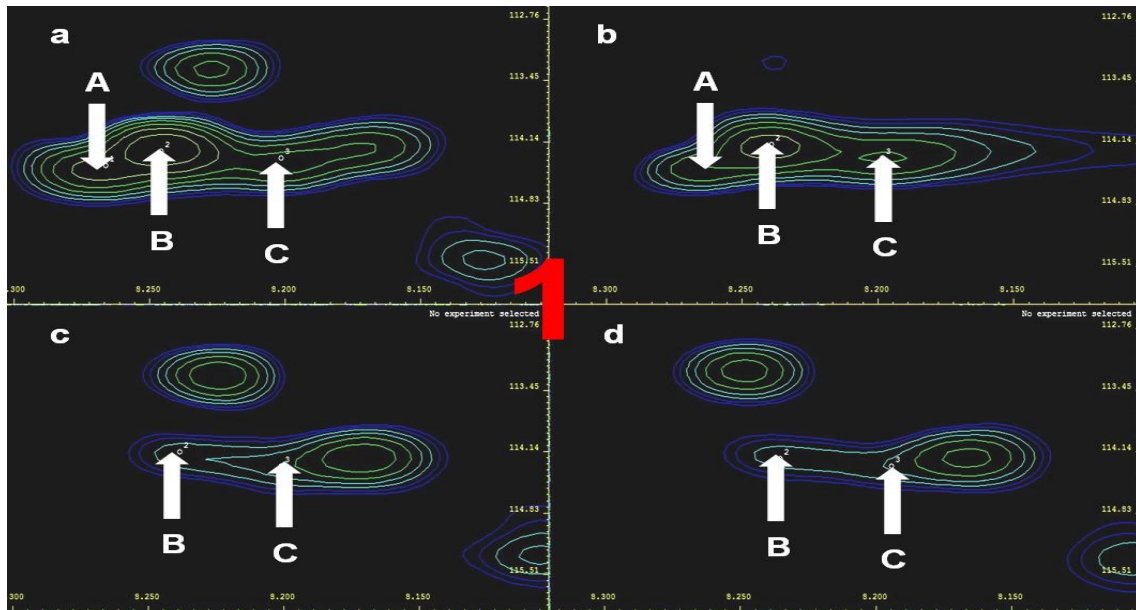


Abbildung 4.13: Markierter Bereich **1** aus **Abbildung 4.12**: (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQC von CanA ohne CaCl_2 (**a**); mit CaCl_2 ($c(\text{CaCl}_2) = 6.4 \text{ mM}$) nach ca. 11 h (**b**); (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQC von K_1 -CanA ohne CaCl_2 (**c**); mit CaCl_2 ($c(\text{CaCl}_2) = 6.4 \text{ mM}$) (**d**) bei 323 K; 50 mM TRIS/HCl, pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O , 0.4 mM DSS, Spektrometer = 800 MHz; signifikante ^{15}N Signale wurden mit den Buchstaben **A**, **B** und **C** markiert

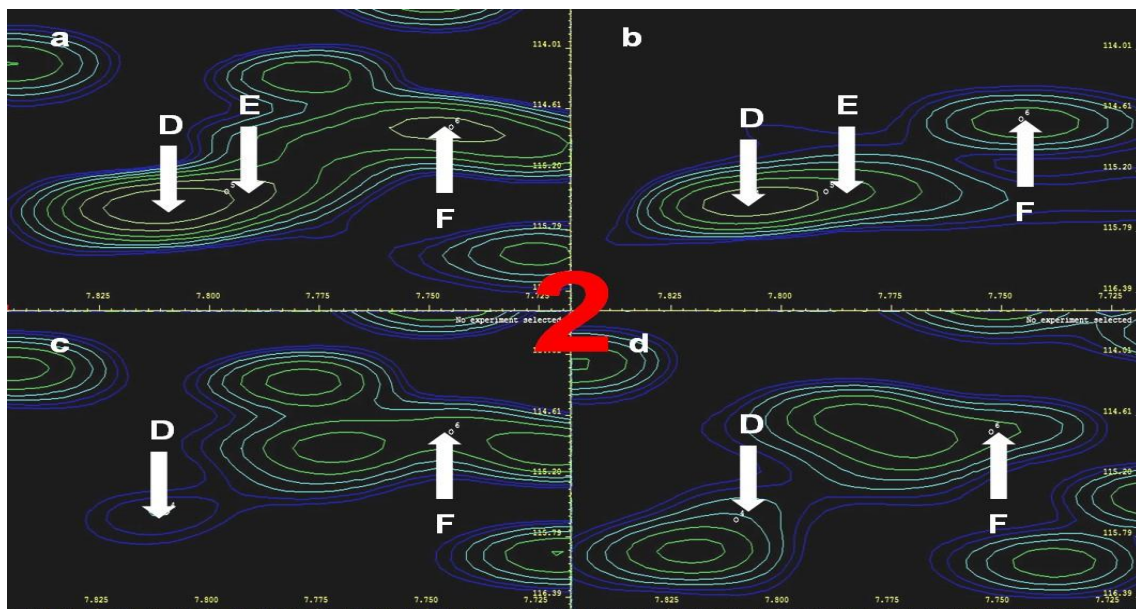


Abbildung 4.14: Markierter Bereich **2** aus **Abbildung 4.12**: (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQC von CanA ohne CaCl_2 (**a**); mit CaCl_2 ($c(\text{CaCl}_2) = 6.4 \text{ mM}$) nach ca. 11 h (**b**); (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQC von K_1 -CanA ohne CaCl_2 (**c**); mit CaCl_2 ($c(\text{CaCl}_2) = 6.4 \text{ mM}$) (**d**) bei 323 K; 50 mM TRIS/HCl, pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O , 0.4 mM DSS, Spektrometer = 800 MHz; signifikante ^{15}N Signale wurden mit den Buchstaben **D**, **E** und **F** markiert

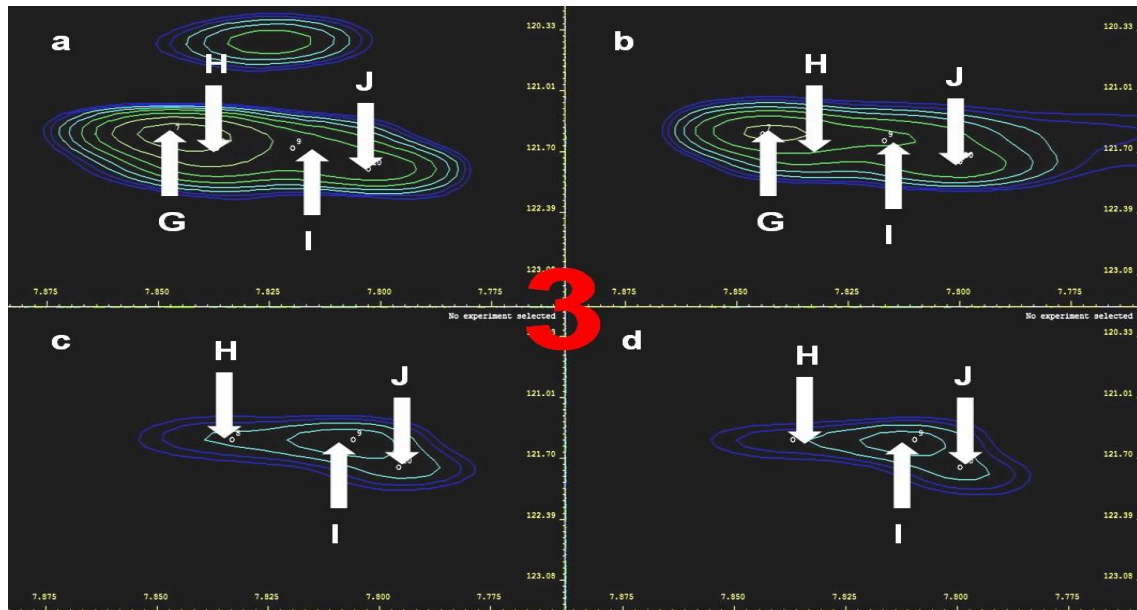


Abbildung 4.15: Markierter Bereich **3** aus **Abbildung 4.12**: (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC von CanA ohne CaCl_2 (**a**); mit CaCl_2 ($c(\text{CaCl}_2) = 6.4 \text{ mM}$) nach ca. 11 h (**b**); (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC von K_1 -CanA ohne CaCl_2 (**c**); mit CaCl_2 ($c(\text{CaCl}_2) = 6.4 \text{ mM}$) (**d**) bei 323 K; 50 mM TRIS/HCl, pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O , 0.4 mM DSS, Spektrometer = 800 MHz; signifikante ^{15}N Signale wurden mit den Buchstaben **G**, **H**, **I** und **J** markiert

4.4 Trypsinverdau von CanA und polymerisierten CanA

Der Verlauf des Trypsinverdaus wie in **Kapitel 3.1.7** beschrieben wurde über NMR und SDS-PAGE für 2 d 21 h dokumentiert.

Aufgrund der hohen Proteinkonzentrationen konnten zwar die Zwischenabbauprodukte, jedoch nicht der vollständige Trypsinverdau erreicht werden.

Der Vergleich der NMR Spektren zu Beginn und gegen Ende des Trypsinverdaus ist für CanA der **Abbildung 4.16** und für die polymerisierten Cannulae von CanA der **Abbildung 4.17** zu entnehmen.

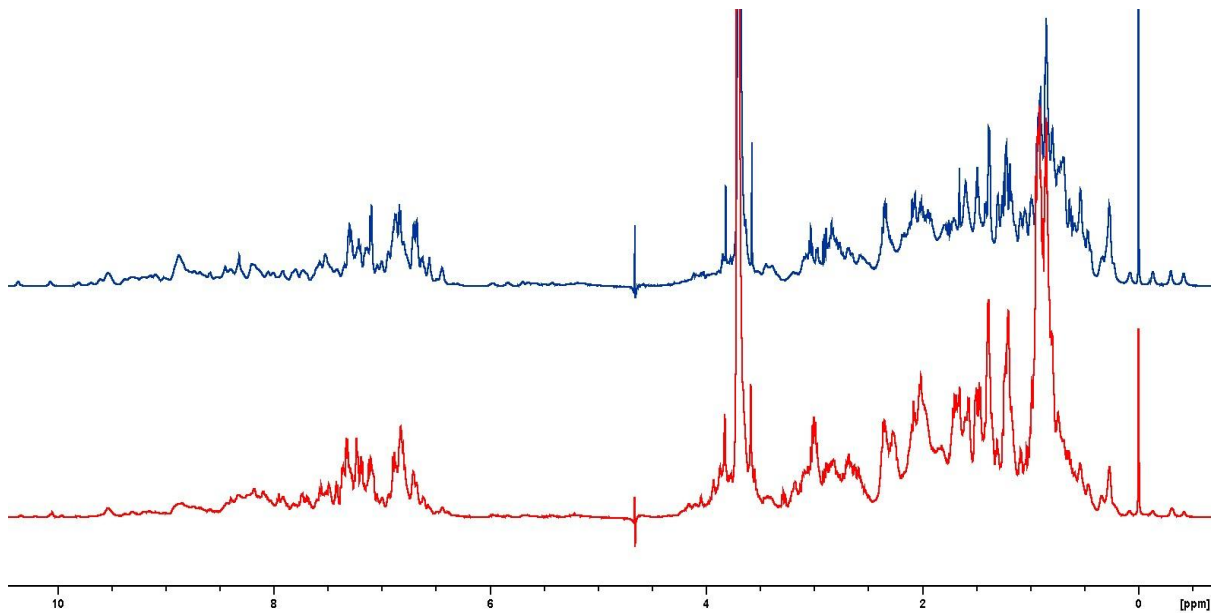


Abbildung 4.16: ¹H Spektren des Trypsinverdaus von CanA bei 310 K; Beginn des Verdaus (**blau**, oben) und Ende des Verdaus nach 2 d 21 h (**rot**, unten); 10 mg lyophilisiertem CanA in 0.52 mL TRIS-Puffer (50 mM TRIS, 50 mM NaCl) mit 50 μ L D₂O, 2 μ L DSS (0.1 M) und 30 μ L der Trypsinstammlösung (5 mg/mL, 30 U pro mg Protein)

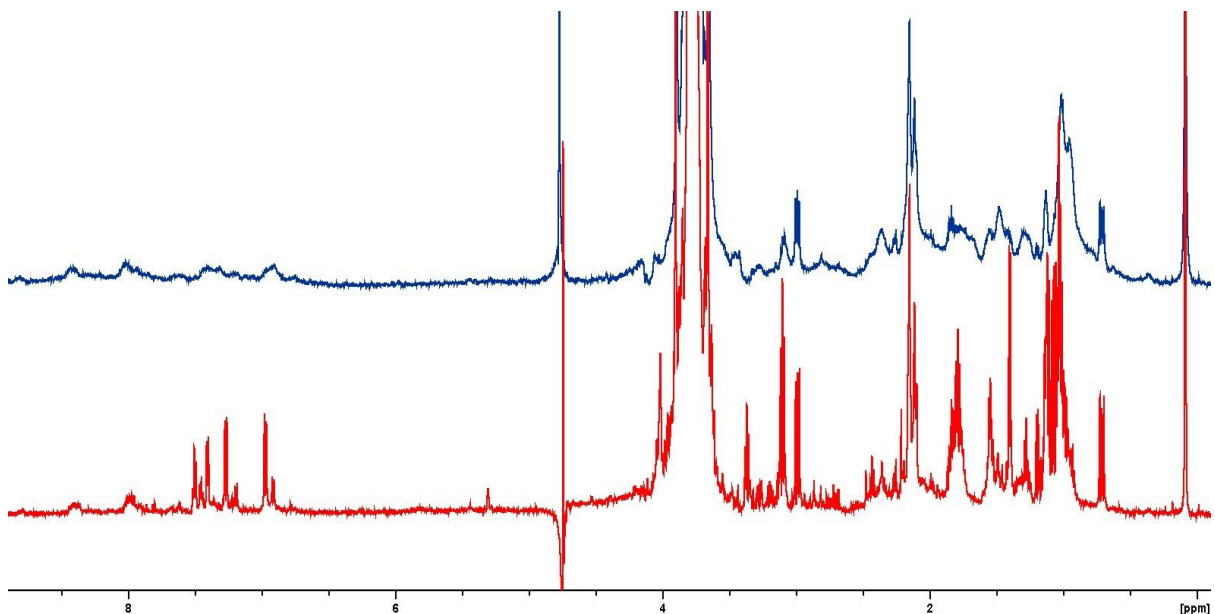


Abbildung 4.17: ¹H Spektren des Trypsinverdaus von polymerisiertem CanA bei 310 K; Beginn des Verdaus (**blau**, oben) und Ende des Verdaus nach 2 d 21 h (**rot**, unten); 10 mg polymerisiertes CanA in 0.52 mL TRIS-Puffer (50 mM TRIS, 50 mM NaCl, 50 μ L D₂O, 2 μ L DSS (0.1 M)) und 30 μ L der Trypsinstammlösung (5 mg/mL, 30 U pro mg Protein)

Dem in einem Heizblock auf 310 K temperierten Trypsinverdau von CanA wurde in den Zeitintervallen 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 22 h, 46 h und 2 d 18 h 10 μ L Proben entnommen mit 50 μ L TRIS-Puffer vermengt, mit Stickstoff eingefroren und am Ende des Verdaus wie in **Kapitel 3.1.2** beschrieben der SDS-PAGE zugeführt (**Abbildung 4.18**).

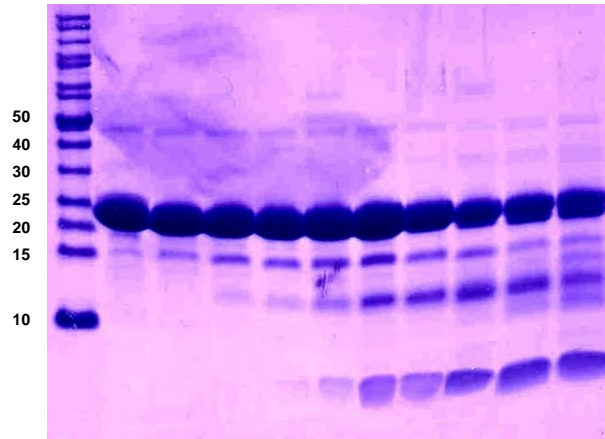


Abbildung 4.18: Trypsinverdau von CanA bei 310 K; Banden von links nach rechts: Proteinstandard PageRuler und nach 0 h, 1 h, 2 h, 3 h, 4 h, 5 h, 6 h, 22 h, 46 h, 2 d 18 h

Dem in einem Heizblock auf 310 K temperierten Trypsinverdau von polymerisiertem CanA wurde aufgrund von logistischer Planung in den Zeitintervallen 0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 9 h, 24 h, 48 h, 2 d 21 h 10 μ L Proben entnommen mit 50 μ L TRIS-Puffer vermengt, mit Stickstoff eingefroren und am Ende des Verdaus wie in **Kapitel 3.1.2** beschrieben der SDS-PAGE zugeführt (**Abbildung 4.19**).

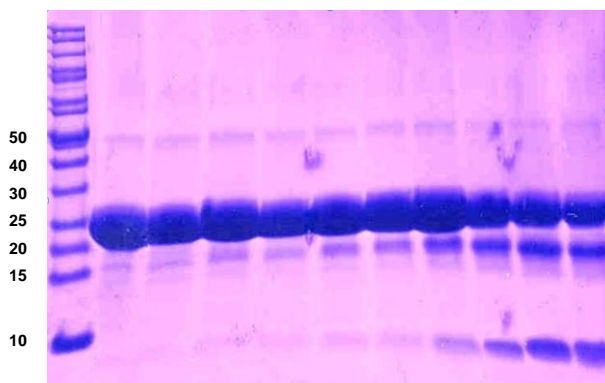
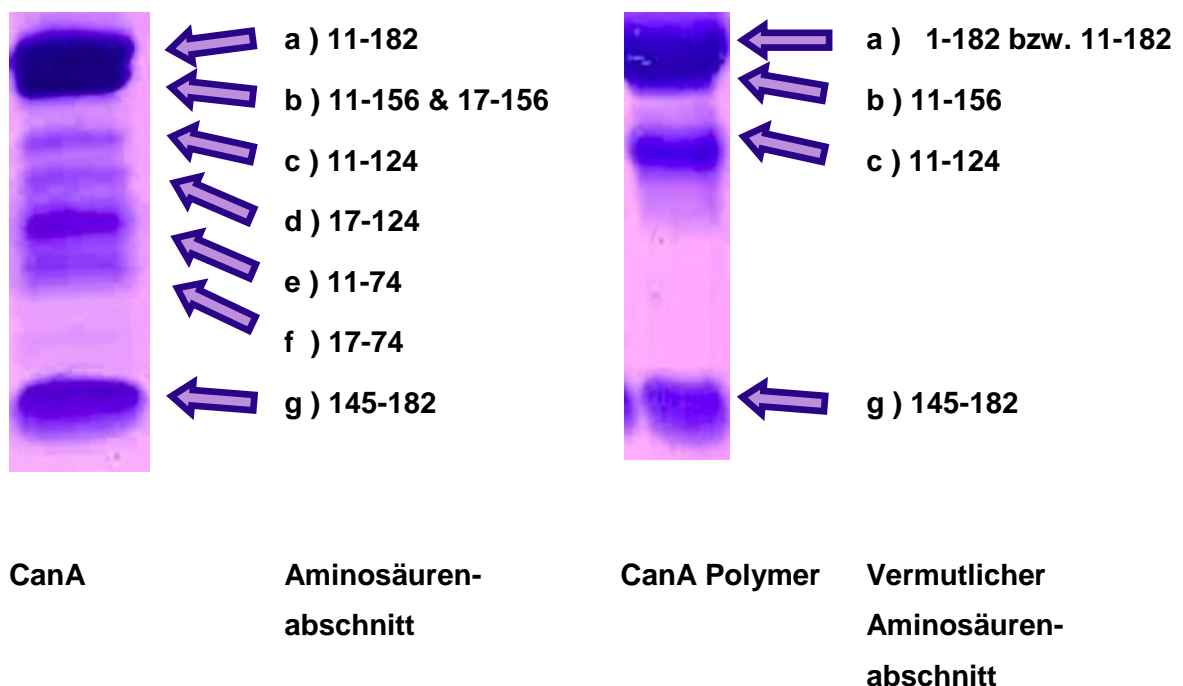


Abbildung 4.19: Trypsinverdau von polymerisierten CanA bei 310 K; Banden von links nach rechts: Proteinstandard PageRuler und nach 0 h, 30 min, 1 h, 2 h, 3 h, 6 h, 9 h, 24 h, 48 h, 2 d 21 h

Wie auf den Gelen zu sehen ist, erfolgt ein kontinuierlicher Verdau von CanA und seinem Polymer über die Zeit. Wobei der Trypsinverdau von CanA und dem Polymer unterschiedliche Abbauprodukte lieferte.

Die Gelbanden des Verdau von CanA nach 2 d 18 h wurde anschließend ausgeschnitten und massenspektrometrisch untersucht. Leider wurde der Verdau des Polymers von CanA nicht der Massenspektrometrie zugeführt. Somit können über die einzelnen Aminosäureabschnitte des Polymers von CanA nur Vermutungen über einen Vergleich der Gelbanden des Polymers mit den Gelbanden des monomeren CanA getroffen werden. Es ist zu beachten, dass durch die unterschiedliche Lauflänge beider Gele eine exakte, vergleichende Darstellung der Gele nicht möglich ist. Da der Trypsinverdau nur zur Ermittlung der natürlichen Schnittstellen in CanA und somit zur Findung eines möglichen Konstruktes benötigt wurde, wurden die Schnittstellen des Polymers nicht weiter verfolgt. Diesbezüglich konnte nur ein subjektiver visueller Vergleich zwischen den Gelbanden des Proteins CanA und seinem Polymer getroffen werden.

Die Massenspektrometrie der 7 ausgeschnittenen Gelbanden von CanA ergab die Einzelmassen für folgende Aminosäuresequenzen des ursprünglichen Proteins CanA:



Die Schnittstellen zwischen den Aminosäuren 16 - 17 und 74 - 75 scheinen bei dem Polymer nicht mehr zugänglich zu sein. Aufgrund dieser natürlichen Schnittstellen wurden zwei Konstrukte von CanA kloniert (Vector pET-17b, T7 Promotor, Restriktionsschnittstelle Nde I). Die Plasmide der Klone, die die Mitarbeiter Johannes Hiltl und Malte Andrasch des Lehrstuhl Kalbitzer herstellten, wurden anschließend in kompetente Zellen von *E. coli* BL21(DE3) transferiert. Das Konstrukt K₁-CanA beinhaltet die Sequenzfolge 11 - 182 und K₂-CanA 11 - 156 der ursprünglichen CanA Sequenz. Die *E. coli* Bakterien mit den Konstrukten wurden anschließend über die Standard-Expression von CanA in LB₀ vervielfältigt, durch sanfte Zentrifugation aufkonzentriert und nach Zugabe von Glycerin (mit einem Glycerinanteil von 20%) mit flüssigem Stickstoff eingefroren. Die Aliquote wurden anschließend bei -80°C gelagert.

4.5 Expression, Reinigung und physikalische Eigenschaften der Konstrukte K₁-CanA und K₂-CanA

K₁-CanA: (AS 11 - 182)

Die Expression und Reinigung von K₁-CanA erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift von CanA. Das Protein war hitzestabil bei 90 °C und erreichte nach der Gelfiltration einen sehr hohen Reinheitsgrad bei sehr großer Ausbeute (ca. 40 mg pro Liter LB₀) wie die **Abbildung 4.20** zeigt.

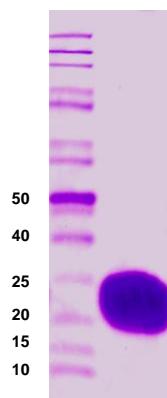


Abbildung 4.20: SDS-Gel nach finaler Gelfiltration von K₁-CanA; links Proteinstandard PageRuler, rechts gereinigtes K₁-CanA stark konzentriert.

Eine Polymerisation von K₁-CanA erwies sich unter den Standardpolymerisierungsbedingungen von CanA mit zweiwertigen Kationen wie Ca⁺² / Mg⁺² (siehe **Kapitel 4.3**) als nicht mehr möglich.

K₂-CanA: (AS 11 - 156)

Die Expression und Reinigung von K₂-CanA erfolgte nach der allgemeinen Vorschrift von CanA. Das Protein war jedoch nicht mehr bis 90 °C hitzestabil. Ein Hitzeschocktest von 40 - 90 °C zeigte dass das Konstrukt K₂-CanA bis 60 °C für 10 min einigermaßen stabil zu sein schien (**Abbildung 4.21**). Bei längerer andauernder Wärmezufuhr (60 °C über mehrere Stunden) nahm die Proteinkonzentration langsam stetig ab.

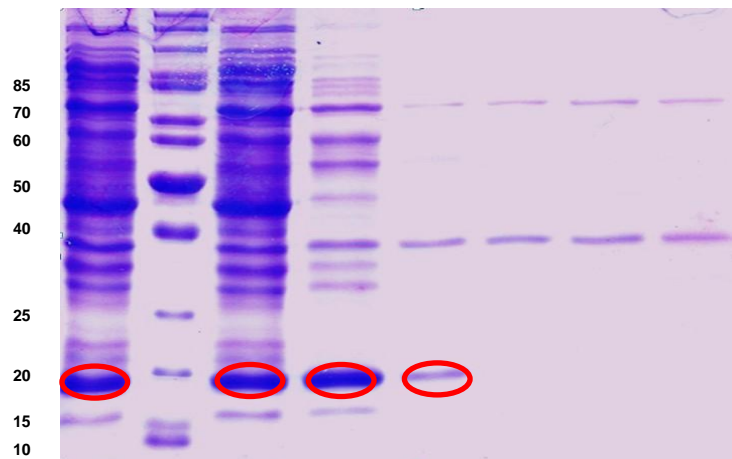


Abbildung 4.21: SDS-Gel des Hitzeschocktest von K₂-CanA; Banden von links nach rechts: Aufschluss von K₂-CanA, Proteinstandard PageRuler, K₂-CanA bei 40 °C, 60 °C, 70 °C, 80 °C, 90 °C und 100 °C; **K₂-CanA** wurde rot markiert

Eine Reinigung mit einem Hitzeschritt von 60 °C lieferte einen annehmbaren Reinheitsgrad, der durch eine wie bei CanA angewandte Ionenaustauschchromatographie und anschließender Gelfiltration deutlich verbessert werden konnte.

Das Konstrukt K₂-CanA war ebenso wie K₁-CanA in Anwesenheit von Ca²⁺ / Mg²⁺ nicht mehr zu einer Polymerisation fähig.

Da das Konstrukt K₁-CanA dem ursprünglichen Protein CanA bis auf die Polymerisierungseigenschaften sowohl in struktureller Hinsicht, als auch in seinen physikalischen Eigenschaften glich, wurde nur das Konstrukt K₁-CanA weiter verfolgt.

Im Folgenden sind weitere physikalische und chemische Eigenschaften von K₁-CanA aufgeführt, welche anhand der Sequenz durch das Programm ProtParam [41,42] berechnet wurden.

Summenformel: C₈₅₄H₁₃₂₇N₂₀₅O₂₆₃S₁

molekulare Masse: 18706.2 Da

theoretischer pI: 4.47

Extinktionskoeffizient: $\epsilon_{(K_1\text{-CanA bei } 280\text{nm})} = 22920 \text{ [cm}^{-1}\text{M}^{-1}\text{]}$

21 negativ geladene Seitenketten (Asp und Glu)

12 positiv geladene Seitenketten (Lys)

4.6 CD-Spektroskopie von K₁-CanA und CanA

Um einen strukturellen Vergleich sowie Informationen über die Sekundärstruktur des Proteins CanA und seinem Konstrukt K₁-CanA zu liefern, wurden CD-Spektren aufgenommen und validiert. Die erhaltenen Daten entsprechen einem partiell sehr gut gefalteten Protein mit folgenden Strukturelementen.

Protein	Aminosäuren	α -Helix	β -Faltblatt	Schleifen	ungeordnet	gesamt
CanA	-10 bis 172	4%	42%	23%	30%	99%
K ₁ -CanA	1 bis 172	5%	41%	22%	31%	99%

Zum Vergleich der Proteine wurden die beobachteten CD-Spektren von CanA und K₁-CanA in **Abbildung 4.22** dargestellt. Das blaue Spektrum entspricht hierbei dem Protein CanA und das rote Spektrum K₁-CanA.

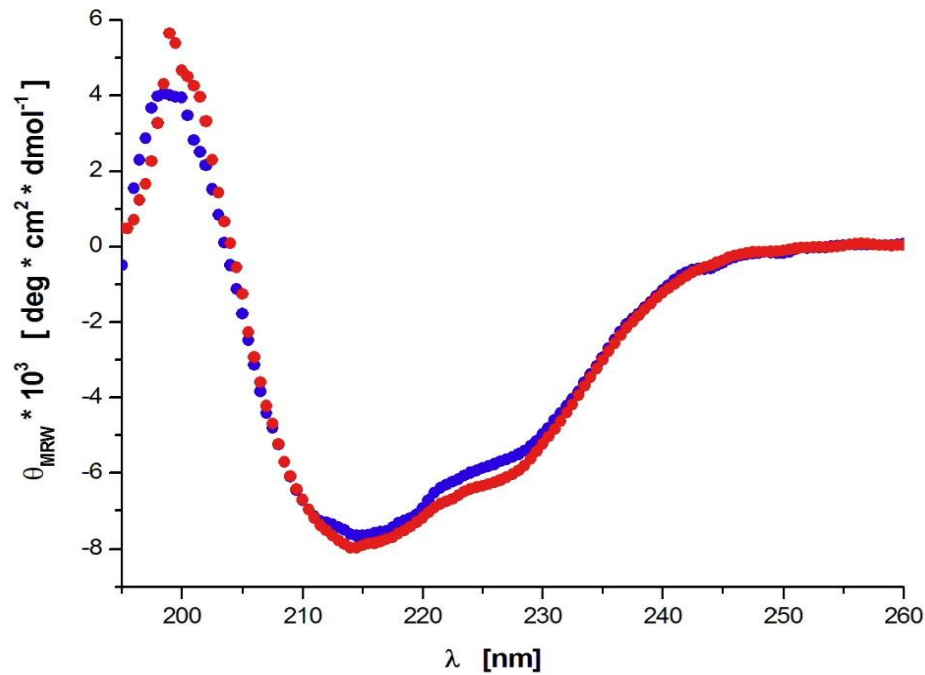


Abbildung 4.22: CD-Spektren von der Proteine CanA und K₁-CanA: c (CanA bzw. K₁-CanA) = 1 mg/mL in H₂O pH = 7, T = 298 K

4.7 Dynamische Lichtstreuung von CanA bei verschiedenen pH Werten

Wie in **Kapitel 3.1.9** beschrieben, wurden die DLS Messungen an dem Lehrstuhl für Biochemie I Prof. em. Dr. Manfred Sumper, Universität Regensburg, an einem Particle Sizer HPPS5001 der Firma Malvern Instruments durchgeführt.

Zu diesem Zeitpunkt war es aufgrund des Gerätes nicht möglich, die gewonnenen Daten zu extrahieren und grafisch zu überarbeiten. Deswegen wurden die hier vorliegenden Ergebnisse der Dynamischen Lichtstreuung im gescannten Zustand verwendet.

Die Analyse zweier unterschiedlicher CanA Proben in wässriger Lösung (c (CanA) = 0.1 mM, 10 mM TRIS, pH = 6 bzw. 9) lieferten nach jeweils 3 maliger Messung folgende Ergebnisse (**Abbildung 4.23** für pH = 6 und **Abbildung 4.24** für pH = 9).

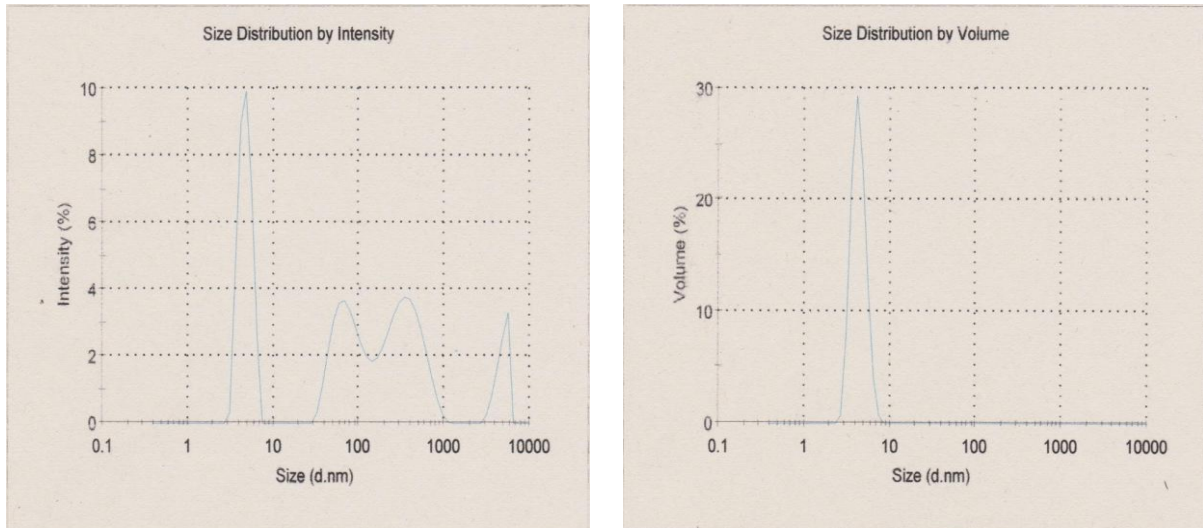


Abbildung 4.23: DLS Messungen von CanA bei pH = 6: Signalintensität [%] gegen Partikelgröße [nm] und Volumen [%] gegen Partikelgröße [nm]. c (CanA) = 0.1 mM, 10 mM TRIS, pH = 6, T = 298 K, Zählrate = 45 kcps, Laufzeit = 125 s

In den untersuchten Proben befanden sich mehrere unterschiedlich große Partikel mit stark unterschiedlicher Population. Die Größenverteilung nach Intensität berücksichtigt allerdings nicht, dass größere Partikel viel mehr Streulicht liefern als kleine Partikel. Deswegen wurde eine Verteilung nach dem in Anspruch genommenen Volumen der Partikel durch die *Mie-Theorie* aus der Intensitätsverteilung errechnet.

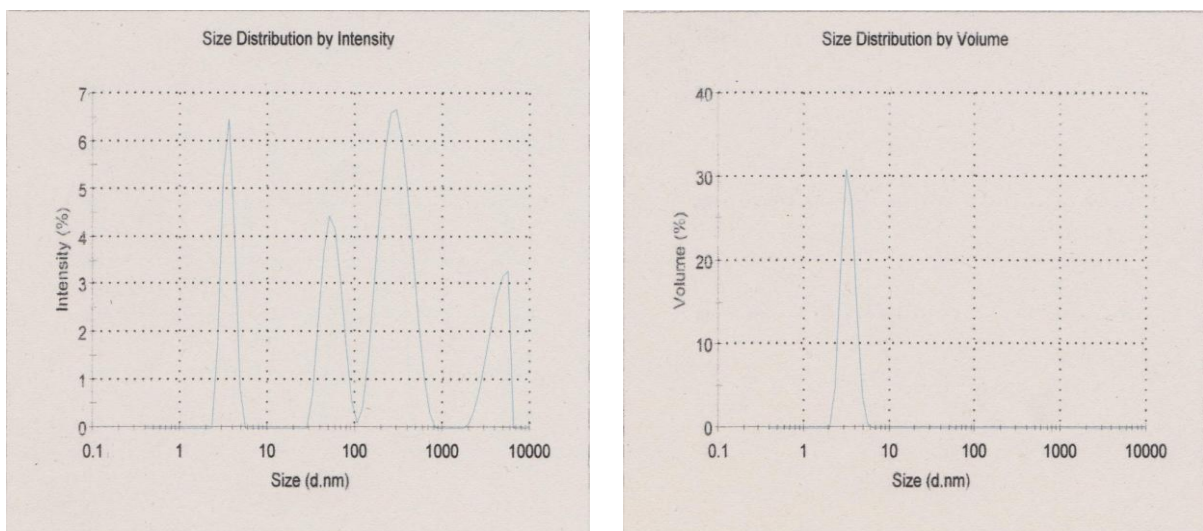


Abbildung 4.24: DLS Messungen von CanA bei pH = 9: Signalintensität [%] gegen Partikelgröße [nm] und Volumen [%] gegen Partikelgröße [nm]. c (CanA) = 0.1 mM, 10 mM TRIS, pH = 9, T = 298 K, Zählrate = 45 kcps, Laufzeit = 125 s

Partikelgrößen mit einem Durchmesser ab 2000 nm werden verfahrenstechnisch als Staubpartikel eingestuft und somit nicht berücksichtigt. Ihr Anteil am Gesamtvolumen lag bei unter 0.01 %.

Trotz mehrfacher Messungen ergaben sich keine exakt konstanten Messergebnisse, insbesondere im niedrigen Partikelbereich. Dies ist vermutlich sowohl auf die Messgenauigkeit des Gerätes, sowie den nicht globulären Zustand von CanA zurückzuführen.

Hierbei erreichten die gemessenen Durchmesser der Hauptpartikelgröße bei pH = 6 ein Minimum von 3.06 nm und ein Maximum von 4.40 nm. Der gemittelte Durchmesser bei pH = 6 betrug 3.38 nm. Bei pH = 9 wurde ein minimaler Durchmesser von 3.08 nm und ein maximaler Durchmesser von 4.76 nm gemessen. Der gemittelte Durchmesser bei pH = 9 betrug 3.48 nm. Die Hauptpartikelgröße machte im Bezug auf das Gesamtpartikelvolumen einen Anteil von 99.9 % aus und war somit die eindeutig vorherrschende Partikelgröße.

Die etwas größeren Hauptpartikel bei pH = 6 mit den gemittelten Partikeldurchmessern von 54.95 nm und 291 nm machten hierbei weniger als 0.1 % des Gesamtpartikelvolumens aus.

Die etwas größeren Hauptpartikel bei pH = 9 mit den gemittelten Partikeldurchmessern von 52.90 nm und 274 nm machten ebenfalls weniger als 0.1 % des Gesamtpartikelvolumens aus.

Der nach Wilkins et al. [36] über die Anzahl der Aminosäuren berechnete theoretische hydrodynamische Radius $R_{h,theor.}$ sollte für ein Protein mit 182 Aminosäuren, welches vollkommen gefaltet ist, bei 1.48 - 2.94 nm liegen. Der durchschnittliche minimale Radius eines globulären, monomeren Proteins mit einem molekularen Gewicht von ca. 20 kDa beträgt 1.78 nm und besitzt somit einen theoretischen, minimalen Durchmesser von 3.56 nm [34].

Diesbezüglich kann davon ausgegangen werden, dass es sich bei der Partikelhauptpopulation um einen Monomer handeln muss.

4.8 FT-IR Messungen von monomeren und polymerisierten CanA

Wie in **Kapitel 3.1.10** beschrieben, wurden die FT-IR-Messungen zum Vergleich der Sekundärstruktur von CanA und seinem Polymer durchgeführt.

Die FTIR-Spektren wurden am Lehrstuhl von Prof. Dr. Pfitzner, Universität Regensburg, aufgenommen. Hierfür wurde jeweils ein stark konzentrierter Proteinfilm aus lyophilisierten CanA und lyophilisierten polymerisierten CanA in H₂O (ca. 1 mg Protein mit 5 µL H₂O) auf das Prisma des FT-IR-Spektrometers aufgetragen und unter Luft getrocknet. Messungen von CanA und polymerisiertem CanA in Lösung mussten aufgrund der starken H₂O Absorptionsbanden (auch in einer D₂O Lösung) verworfen werden. Die **Abbildung 4.25** gibt die Absorbanz des getrockneten Proteinfilms von CanA (rot, unten) und seinem Polymer (blau, oben) über den Spektralbereich von 400 bis 4000 cm⁻¹ wieder. Hierbei wird deutlich, dass beide Proteine bzw. Proteinaggregate einen nahezu vollständig gleichen Absorbanzverlauf aufweisen.

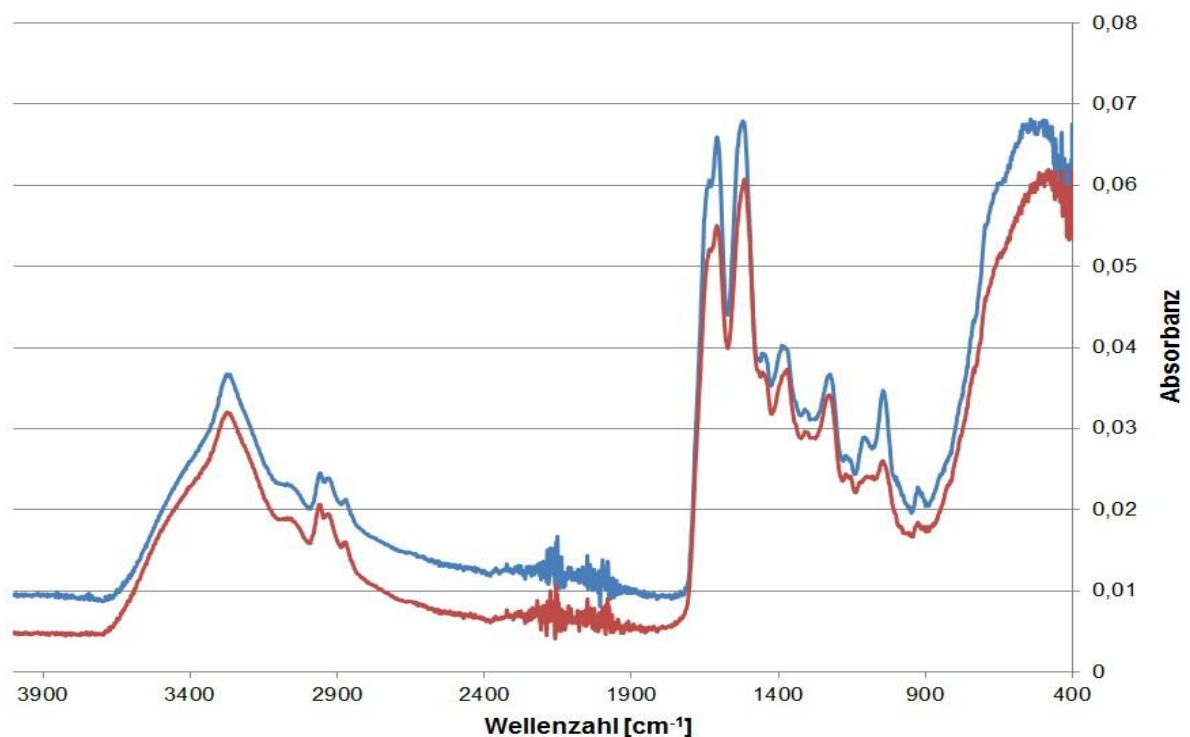


Abbildung 4.25: FT-IR Messung der Proteinfilme: gesamtes FT-IR Spektrum von CanA (rot, unten) und des Polymers von CanA (blau, oben) bei 298 K

Der für die Sekundärstruktur aussagekräftigste Bereich ist hierbei der Amidbereich zwischen 1450 und 1750 cm^{-1} . Die **Abbildung 4.26** zeigt den Ausschnitt der Amid-I- und Amid-II-Bande von CanA (rot, unten) und polymerisiertem CanA (blau, oben). Das starke Signal bei 1635 cm^{-1} ist charakteristisch für C=O Streckschwingungen der Peptidbindungen mit einer stark ausgeprägten β -Faltblattstruktur.

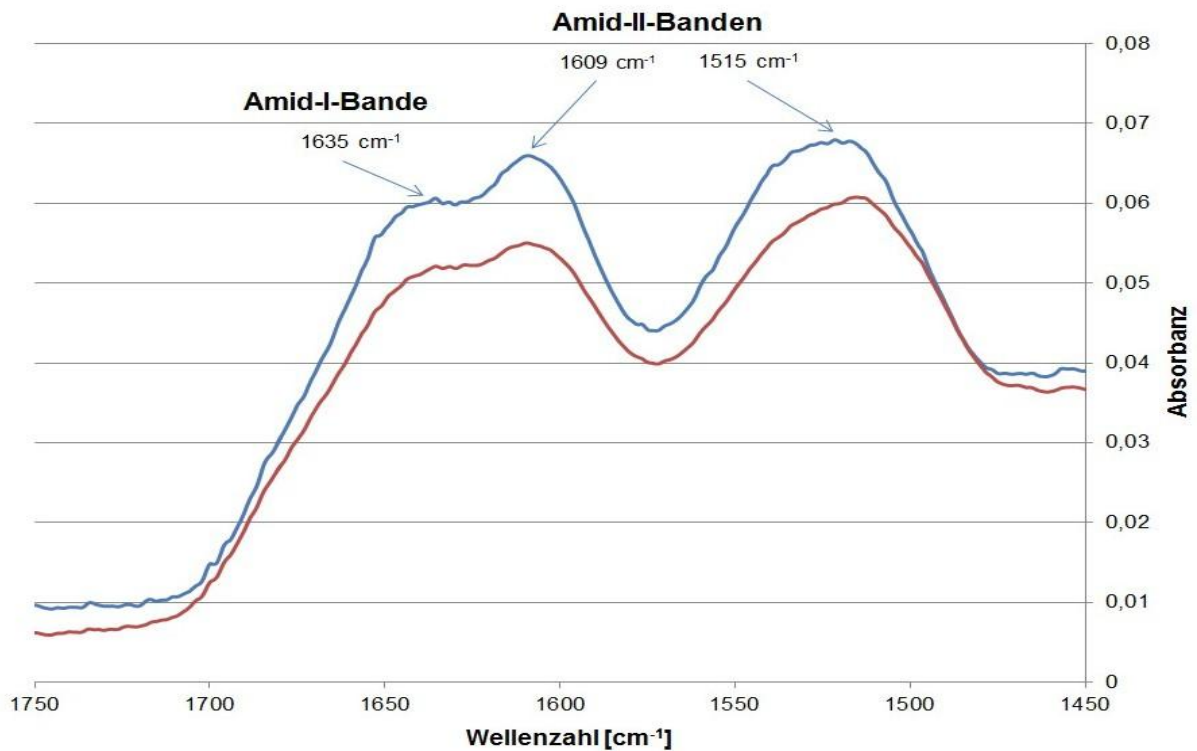


Abbildung 4.26: FT-IR Messung der Proteinfilme: Amidbandenausschnitt von CanA (rot, unten) und des Polymers von CanA (blau, oben) bei 298 K

4.9 TEM-Messungen von monomeren, polymerisierten CanA und K_1 -CanA

Die Ergebnisse der wie unter **Kapitel 3.1.11** beschrieben präparierten und vermessenen CanA-Monomer-, CanA-Polymer- und zur Polymerisation angesetzten K_1 -CanA-Proben werden im Folgenden erläutert.

Die zur Referenz angesetzte unpolymersierte monomere CanA Probe zeigte im Vergleich zur polymerisierten Probe nur sehr wenige, vereinzelte Cannulae, die auf die Eigenpolymerisationseigenschaften von CanA zurückzuführen sind (**Abbildung 4.27 links**). Die auftretende Unschärfe der Aufnahmen ist auf die Menge unpolymersierten CanAs zurückzuführen. Die **Abbildung 4.27 rechts** zeigt sich aneinanderlagernde CanA Cannulae in der monomeren Probe.

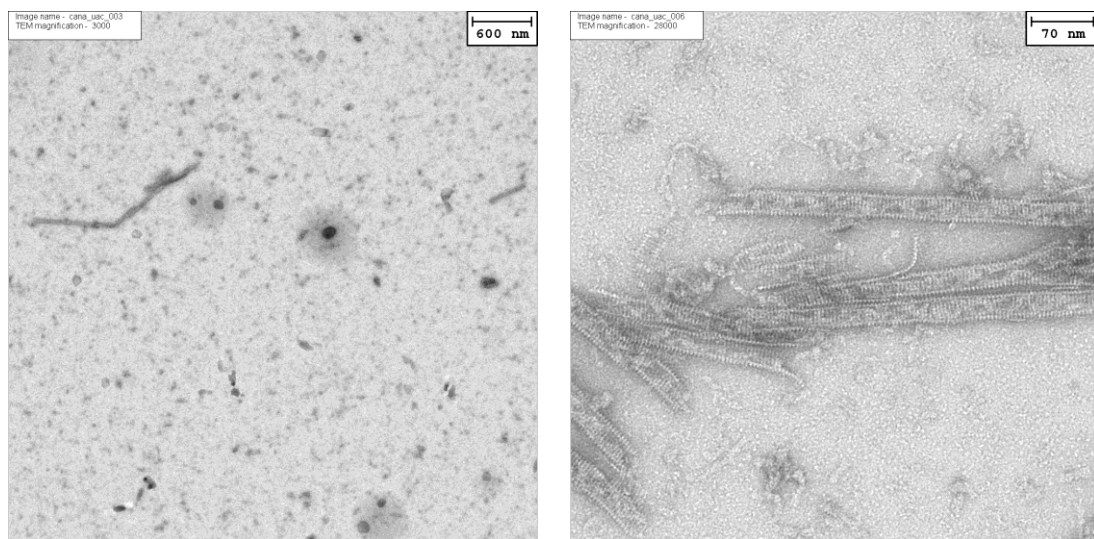


Abbildung 4.27: TEM-Aufnahmen der monomeren CanA Proben mit einer Vergrößerung um den Faktor 3000 (**links**) und vermutlich aggregierendem CanA mit einer Vergrößerung um den Faktor 28000 (**rechts**)

Die zur Polymerisation angesetzte CanA Probe zeigte im Vergleich zur monomeren CanA Referenzprobe einen um das Vielfache stärkeren Polymerisierungsgrad, mit bedeutend größerer Aggregatbildung (**Abbildung 4.28**). Ebenso zu sehen ist das deutlich bessere Signal zu Rauschen Verhältnis der Aufnahmen, was auf nur wenig unpolymersiertes, monomeres CanA schließen lässt.

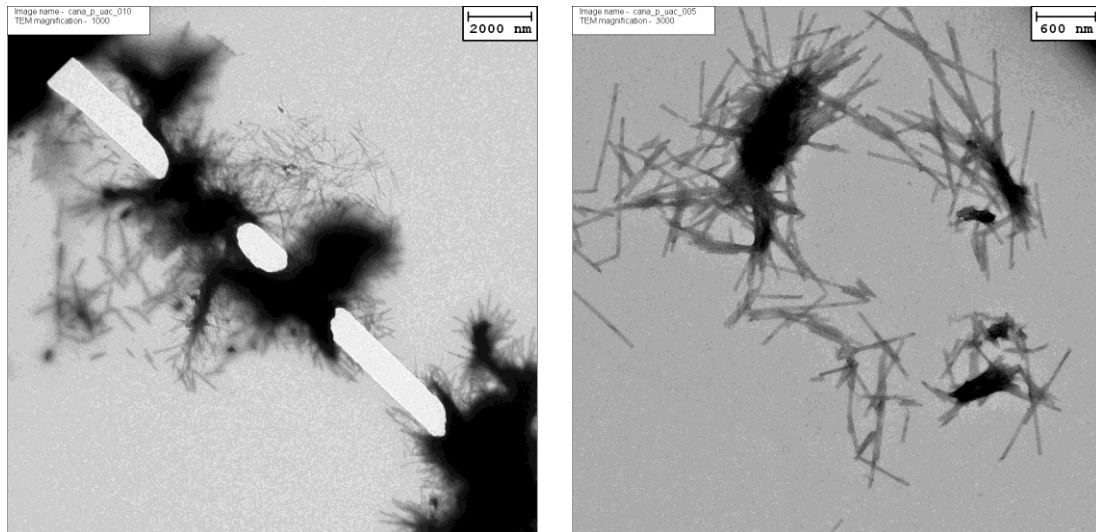


Abbildung 4.28: TEM-Aufnahmen von polymerisiertem CanA mit einer Vergrößerung um den Faktor 1000 (**links**) und 3000 (**rechts**)

Vereinzelt auftretende CanA Cannulae wurden ebenfalls detektiert. Jedoch handelt es sich hierbei vermutlich überwiegend um bei der Probenpräparation entstandene einzelne Bruchstücke (mit erkennbaren Bruchkanten an den Enden) größerer CanA Oligomere (**Abbildung 4.29**). Der Durchmesser der durch Polymerisation entstandenen Cannulae variierte von 25 bis zu 35 nm. Der gemittelte Durchmesser von ca. 30 nm ist gegenüber dem Durchmesser natürlich gewachsener Cannulae mit 25 nm Außendurchmesser etwas größer.

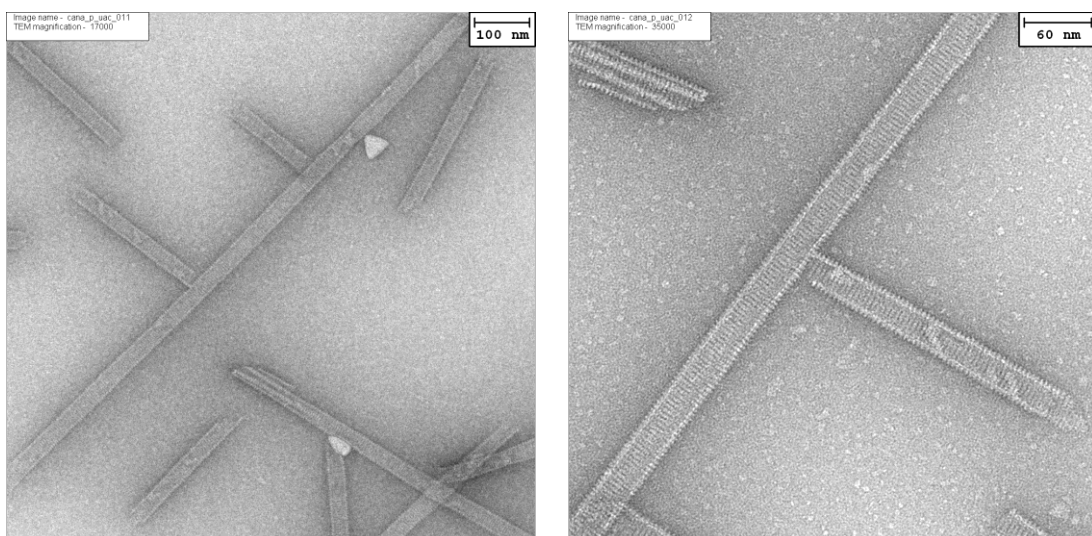


Abbildung 4.29: TEM-Nahaufnahmen von einzelnen polymerisierten CanA Cannulae mit einer Vergrößerung um den Faktor 17000 (**links**) und 35000 (**rechts**)

Die zur Polymerisation angesetzten K₁-CanA Proben zeigten hingegen keinerlei Polymerisationseigenschaften. Auch unter deutlich stärkeren Polymerisationsbedingungen (mit 10 mM MgCl₂ und 10 mM CaCl₂), unter denen herkömmliches CanA innerhalb weniger Sekunden mit dem (visuell sichtbaren) Ausfall des Polymers reagiert, zeigte K₁-CanA keinerlei Anzeichen zur Ausbildung von Cannulae (**Abbildung 4.30**). Das Vorhandensein größerer Mengen unpolymerisierten K₁-CanAs wird wie bei den monomeren CanA Proben durch die Unschärfe der Aufnahmen bei höherer Auflösung deutlich (**Abbildung 4.30 rechts**).

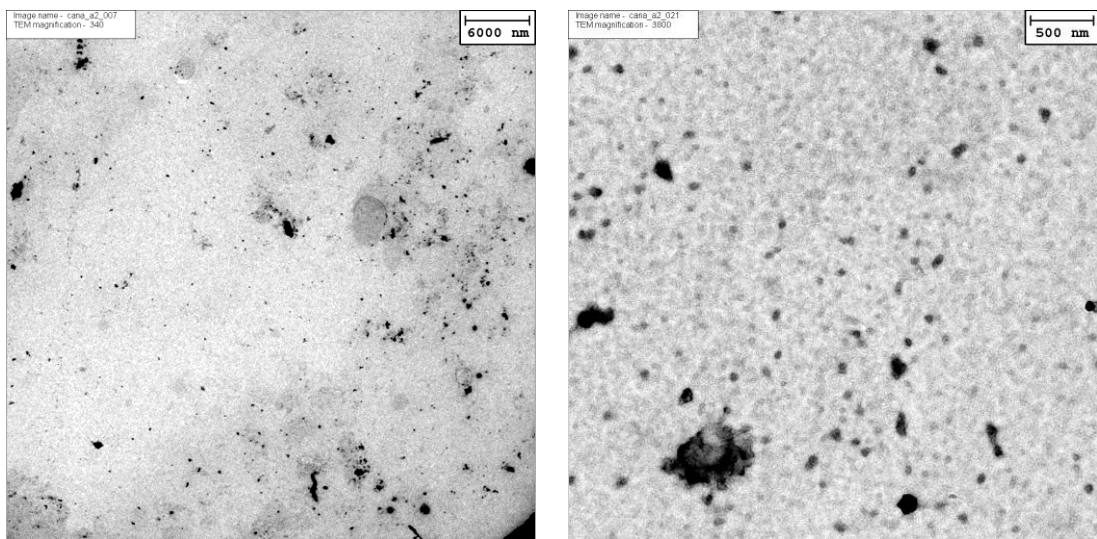


Abbildung 4.30: TEM-Aufnahmen der zur Polymerisation angesetzten K₁-CanA Proben mit einer Vergrößerung um den Faktor 340 (**links**) und 3800 (**rechts**)

Die bei der Ionenaustauschchromatographie isolierte, thermophile unbekannte Fraktion wurde ebenfalls elektronenmikroskopisch untersucht (**Abbildung 4.31**). Es scheint sich hierbei um eine amorphe Oligomerstruktur zu handeln. Leider erbrachten zusätzliche spektroskopische Untersuchungen keine weiteren Informationen über die Art dieser Proteinfraction.

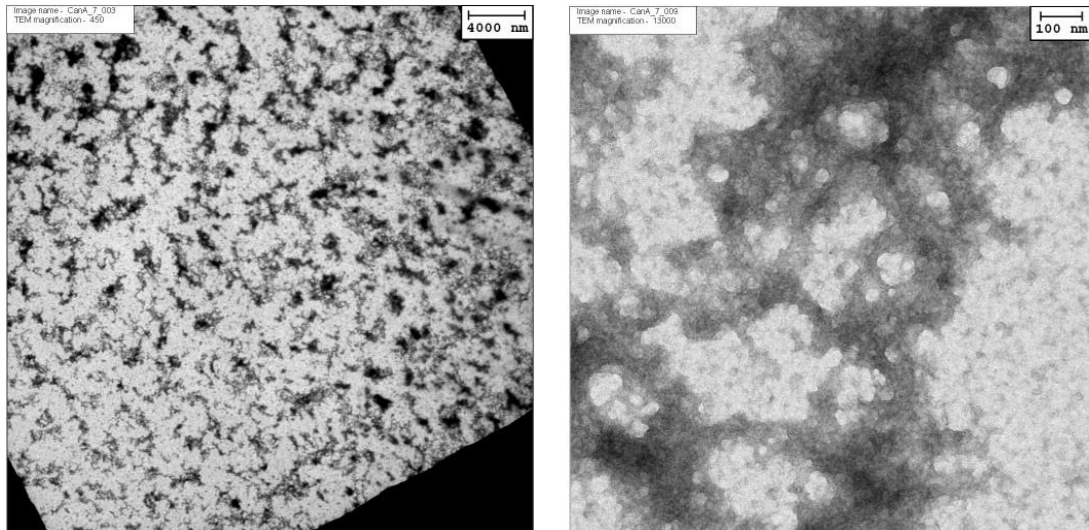


Abbildung 4.31: TEM-Aufnahmen der unbekannten Fraktion der Ionenaustauschchromatographie mit einer Vergrößerung um den Faktor 450 (**links**) und 13000 (**rechts**)

4.10 Definierung des Aggregationszustandes von CanA in Lösung durch ^1H -NMR-Diffusionsmessungen

Zur Definierung des Aggregationszustandes von CanA wurden diesbezüglich ^1H -NMR-Diffusionsmessungen, wie im Methodenteil **Kapitel 3.2.2.2** beschrieben, durchgeführt. Der durch den Gradienten bedingte Signalabfall der Proteinsignale wurde gegen den angelegten Gradienten aufgetragen. Die Stabilität des Gradientensystems wurde mit Polyacrylamid nachgewiesen (**Abbildung 4.32, grau, oben**).

Die **Abbildung 4.32** zeigt die Veränderung des Aggregationszustandes von CanA in Abhängigkeit des pH Werts. Der pH Wert der Probe wurde 6 h zuvor mit HCl/NaOH eingestellt. Mit DSS als Referenz (**Abbildung 4.32, schwarz, unten**) zeigt CanA in Lösung bei pH = 6 eine molekulare Masse von 64.63 kg/mol (**Abbildung 4.32, rot, mittig oberhalb**) und bei pH = 9 eine molekulare Masse von 28.20 kg/mol (**Abbildung 4.32, blau, mittig unterhalb**).

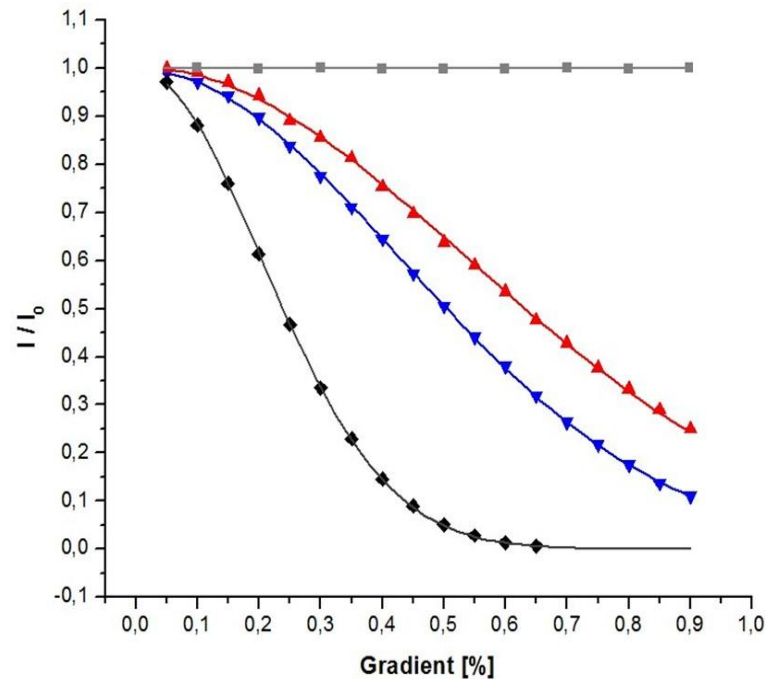


Abbildung 4.32: Aggregationszustandsveränderung bei pH Änderung: Plot von I/I_0 gegen die Gradientenstärke. I = Signalintensität bei entsprechender Gradientenstärke; I_0 = Signalintensität zu Beginn bei Gradientenstärke 0,02. DSS dient in der Probe als Referenz. c (CanA) = 0,5 mM, 10 mM Phosphatpuffer, pH = 6,6 und pH = 9, $T = 318$ K, 1 μ M EDTA. ■ = Polyacrylamid (Stabilität des Gradientenfeldes), ◆ = DSS (Referenzstandard), ▲ = CanA bei pH = 6, ▼ = CanA bei pH = 9

Zur Kontrolle wurden die Messungen nochmals durchgeführt und weitere Proben mit pH = 6 und 9 vermessen. Es stellte sich heraus, dass die molekulare Masse für die Probe bei pH = 9 von 28.20 kg/mol bei der Kontrollmessung nach einer Verweildauer von ca. 4 h bei RT nicht mehr reproduzierbar war. Sie betrug nun 40.15 kg/mol. Ebenso brachten die Vermessungen neu hergestellter Proben zwar ähnliche, allerdings nicht identische molekulare Massen hervor. Diese Feststellungen ließen eine voranschreitende Eigenpolymerisation von CanA vermuten.

Diesbezüglich wurde mit der besagten Probe eine Gelfiltration durchgeführt, bei der nur sehr große Oligomere abgetrennt wurden. Ein Vergleich der Diffusionsmessreihen der Probe bei pH = 9 ergab, dass vor der Gelfiltration eine molekulare Masse von 40.15 kg/mol und nach der Gelfiltration von 22.31 kg/mol ermittelt werden konnte (**Abbildung 4.33**).

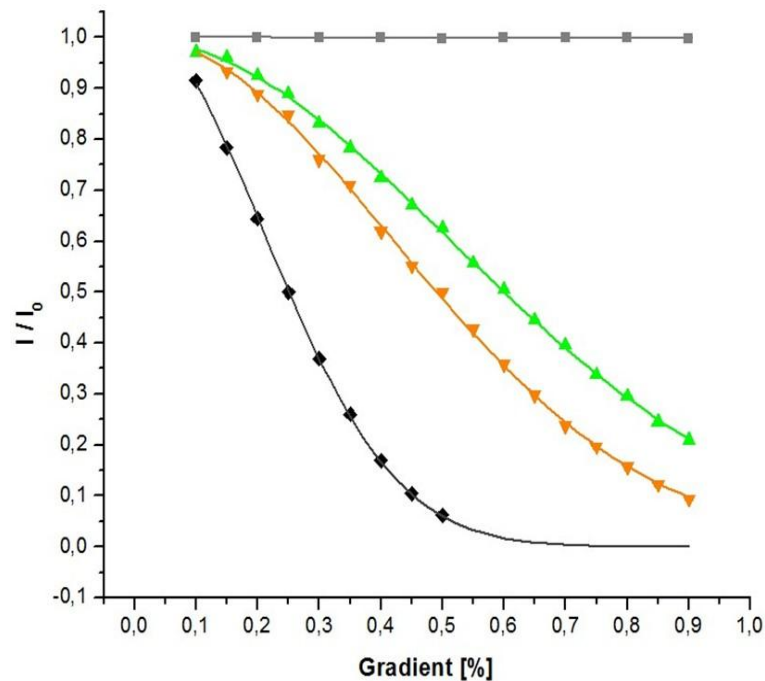


Abbildung 4.33: Diffusionsmessung vor und nach einer Gelfiltration der gleichen Probe: Plot von I/I_0 gegen die Gradientenstärke. I = Signalintensität bei entsprechender Gradientenstärke; I_0 = Signalintensität zu Beginn bei Gradientenstärke 0,02. DSS dient in der Probe als Referenz. c (CanA) = 0,6 mM, 10 mM Phosphatpuffer, pH = 9, T = 318 K, 1 μ M EDTA. ■ = Polyacrylamid (Stabilität des Gradientenfeldes), ◆ = DSS (Referenzstandard), ▲ = CanA vor der Gelfiltration bei pH = 9, ▼ = CanA nach der Gelfiltration bei pH = 9

Die Diffusionskonstante D von CanA nach der Gelfiltration bei pH = 9 betrug $2,87 \pm 0,03 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2/\text{s}$, der hydrodynamische Radius R_h $1,68 \pm 0,07 \text{ nm}$ und ein sich daraus ergebende Durchmesser d von $3,35 \pm 0,14 \text{ nm}$.

Der nach Wilkins et al. [36] über die Anzahl der Aminosäuren berechnete theoretische hydrodynamische Radius $R_{h,theor.}$ sollte für ein Protein mit 182 Aminosäuren, welches vollkommen gefaltet ist, bei 1,48 - 2,94 nm liegen.

Der durchschnittliche minimale Radius eines globulären, monomeren Proteins mit einem molekularen Masse von ca. 20 kDa beträgt 1,78 nm [34].

4.11 Ca^{2+} / Mg^{2+} Titrationen

4.11.1 (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC-Titrationen von $\text{K}_1\text{-CanA}$ und CanA mit Ca^{2+} / Mg^{2+}

Der größte Vorteil der *sofast*-HMQC-Spektroskopie nach Schanda [15, 16] gegenüber gebräuchlichen multidimensionalen heteronuklearen NMR Standardmethoden ist die deutlich geringere Messzeit (ca. 1/4) bei einem in etwa gleich bleibendem Signal zu Rauschverhältnis bei geringen Proteinmengen ($c = \text{ca. } 0.1 \text{ mM}$). Durch die für multidimensionale NMR-Messmethoden kontraproduktive Polymerisationseigenschaft von CanA in Anwesenheit von Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} Ionen spielte die Verkürzung der Messzeiten eine tragende Schlüsselrolle.

4.11.1.1 Bestimmung der Bindungsstellen

Die Bestimmung der Bindungsstellen für $\text{K}_1\text{-CanA}$ bzw. CanA mit Ca^{2+} und Mg^{2+} Ionen erfolgte analog **Kapitel 3.2.4.2**. Hierfür wurden die Proben mit $\text{K}_1\text{-CanA}$ ($c = 0.17 \text{ mM}$) und CanA ($c = 0.12 \text{ mM}$) bei 323 K mit CaCl_2 bzw. MgCl_2 titriert.

CaCl_2 wurde stufenweise in Verdopplungsschritten ab einem Verhältnis von 1 : 0.6 ($c(\text{CaCl}_2) = 0.1 \text{ mM}$) bis zu einem Verhältnis von 1 : 150 ($c(\text{CaCl}_2) = 25.6 \text{ mM}$) zu $\text{K}_1\text{-CanA}$ titriert. Bei einem Verhältnis von 1 : 38 ($c(\text{CaCl}_2) = 6.4 \text{ mM}$) erreichen die Bindungsstellen von $\text{K}_1\text{-CanA}$ weitestgehend ihre Sättigung für Ca^{2+} . Danach verschieben sich alle NMR-Signale äquivalent zur zunehmenden Salzkonzentration. Die **Abbildung 4.34** zeigt die Änderungen der chemischen Verschiebungen der NMR-Signale in einem ^{15}N -HSQC, in Abwesenheit (**blau**) und in Anwesenheit (**rot**) von CaCl_2 (Verhältnis $\text{K}_1\text{-CanA} : \text{CaCl}_2 = 1 : 38$; $c(\text{CaCl}_2) = 6.4 \text{ mM}$).

Hierbei hebt sich die Änderung der chemischen Verschiebungen der Aminosäuren **K104** und **E105** mit ihrer umliegenden Umgebung von den restlichen chemischen Verschiebungen deutlich ab.

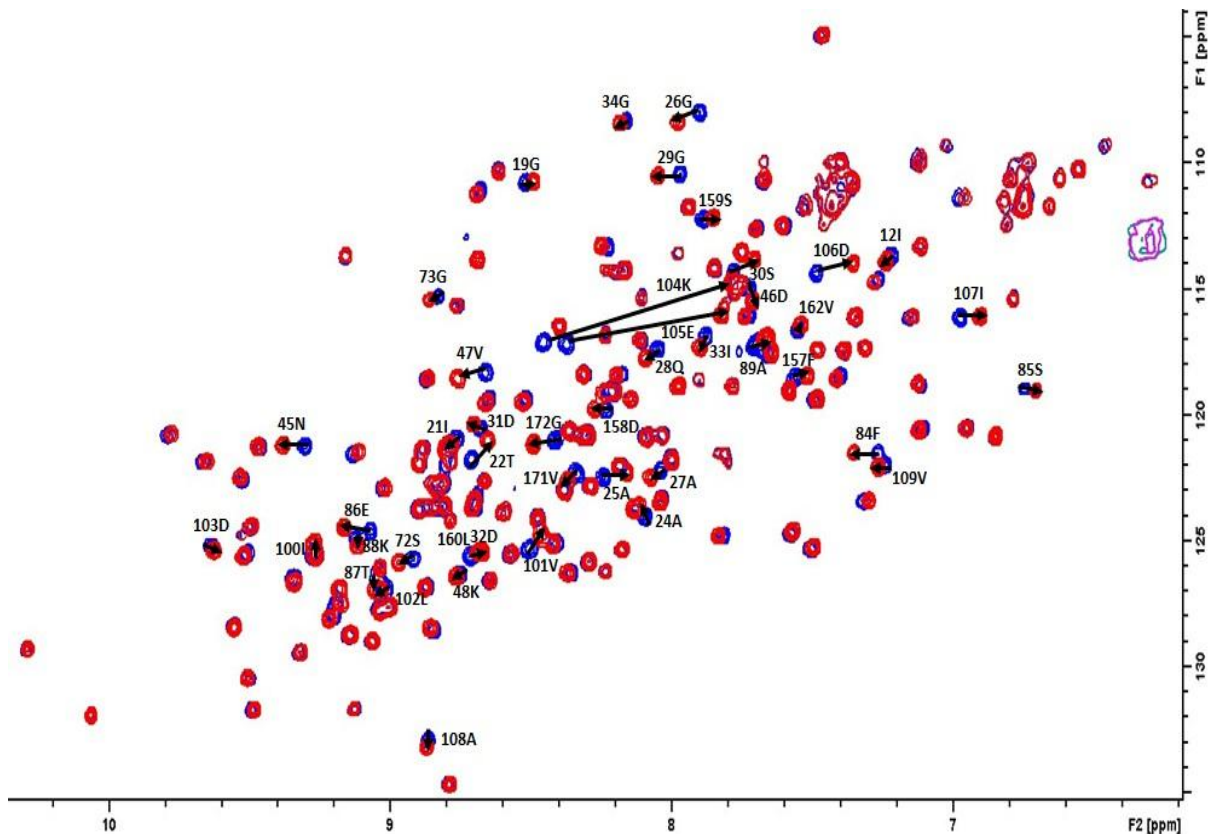


Abbildung 4.34: (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQC von K_1 -CanA ($c = 0.17 \text{ mM}$) in Abwesenheit (**blau**) und in Anwesenheit (**rot**) von CaCl_2 im Verhältnis 1 : 38 ($c(\text{CaCl}_2) = 6.4 \text{ mM}$) bei 323 K (50 mM TRIS/HCl, pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O , 0.4 mM DSS, Spektrometer = 800 MHz)

MgCl_2 wurde ebenfalls stufenweise in Verdopplungsschritten ab einem Verhältnis von 1 : 0.6 ($c(\text{MgCl}_2) = 0.1 \text{ mM}$) bis zu einem Verhältnis von 1 : 300 ($c(\text{MgCl}_2) = 51.2 \text{ mM}$) zu K_1 -CanA titriert. Bei einem Verhältnis von 1 : 76 ($c(\text{MgCl}_2) = 12.8 \text{ mM}$) erreichen die Bindungsstellen von K_1 -CanA weitestgehend ihre Sättigung für Mg^{2+} . Danach verschieben sich alle NMR-Signale äquivalent zur zunehmenden Salzkonzentration. Die **Abbildung 4.35** zeigt die Änderungen der chemischen Verschiebungen der NMR-Signale in einem ^{15}N -HSQC, in Abwesenheit (**blau**) und in Anwesenheit (**rot**) von MgCl_2 (Verhältnis K_1 -CanA : $\text{MgCl}_2 = 1 : 76$; $c(\text{MgCl}_2) = 12.8 \text{ mM}$). Die NMR-Signale verschieben sich zwar proportional gleichmäßig im Bezug zur Titration mit CaCl_2 , jedoch im weitaus geringerem Maß.

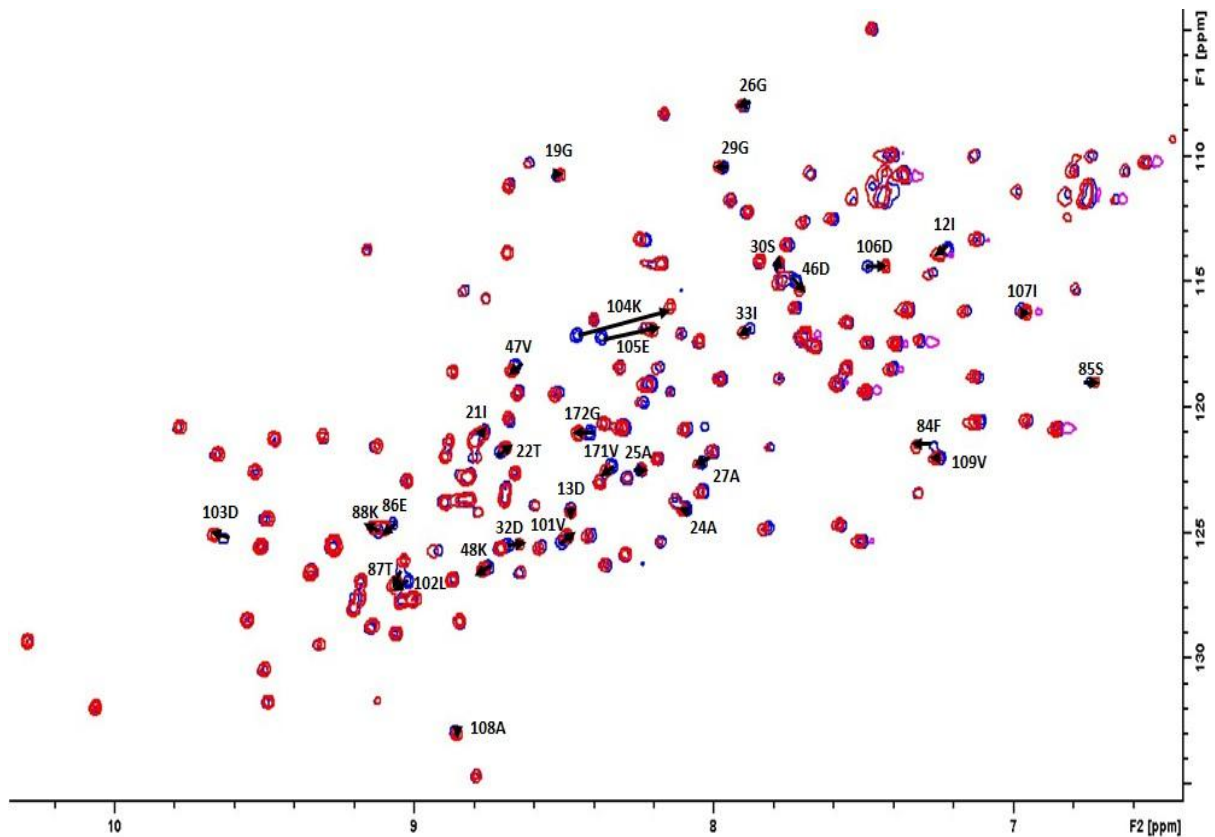


Abbildung 4.35: (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQC von $\text{K}_1\text{-CanA}$ ($c = 0.17 \text{ mM}$) in Abwesenheit (blau) und in Anwesenheit (rot) von MgCl_2 im Verhältnis 1 : 76 ($c(\text{MgCl}_2) = 12.8 \text{ mM}$) bei 323 K (50 mM TRIS/HCl, pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O , 0.4 mM DSS, Spektrometer = 800 MHz)

Zur Bestimmung der Bindungszentren wurden die berechneten kombinierten chemischen Verschiebungen von ^1H und ^{15}N (siehe Formel 3.12) gegen die Positionen der Aminosäuren aufgetragen (**Abbildung 4.36** und **Abbildung 4.37**). Zur besseren Veranschaulichung wurde die Skala in **Abbildung 4.37** gegenüber der **Abbildung 4.36** zweifach vergrößert dargestellt.

Bei der Titration von $\text{K}_1\text{-CanA}$ mit Ca^{2+} erreicht $\Delta\delta_{\text{combined}}$ von **K104** einen Wert von 0.85 ppm und **E105** einen Wert von 0.62 ppm mit einem σ_o^{corr} von 0.027. Bei der Titration mit Mg^{2+} erreicht $\Delta\delta_{\text{combined}}$ von **K104** nur einen Wert von 0.42 ppm und **E105** einen Wert von 0.19 ppm mit einem σ_o^{corr} von 0.017.

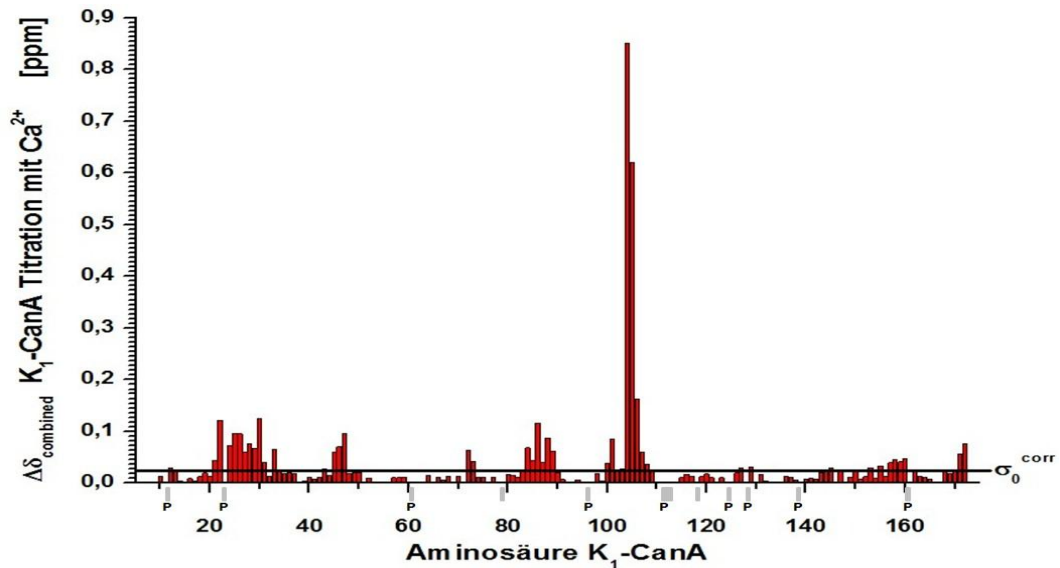


Abbildung 4.36: Balkendiagramm der kombinierten chemischen Verschiebungen aufgetragen gegen die Positionen der Aminosäuren von K₁-CanA bei der Titration mit 6.4 mM CaCl₂. Die kombinierten chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{\text{combined shift}}$) wurden anhand der **Formel 3.12** mit ¹⁵N-gelabeltem K₁-CanA (c (K₁-CanA) = 0.17 mM) bei 323 K berechnet. Die korrigierte Standardabweichung zu Null $\sigma_0^{\text{corr}} = 0.027$ (**schwarze Linie**) wurde nach der *Methode von Schumann* [13] berechnet. In **grau** wurden diejenigen Aminosäuren unterlegt, die nicht zuordenbar waren (T79, Y111, T118, sowie alle Proline - mit **P** gekennzeichnet).

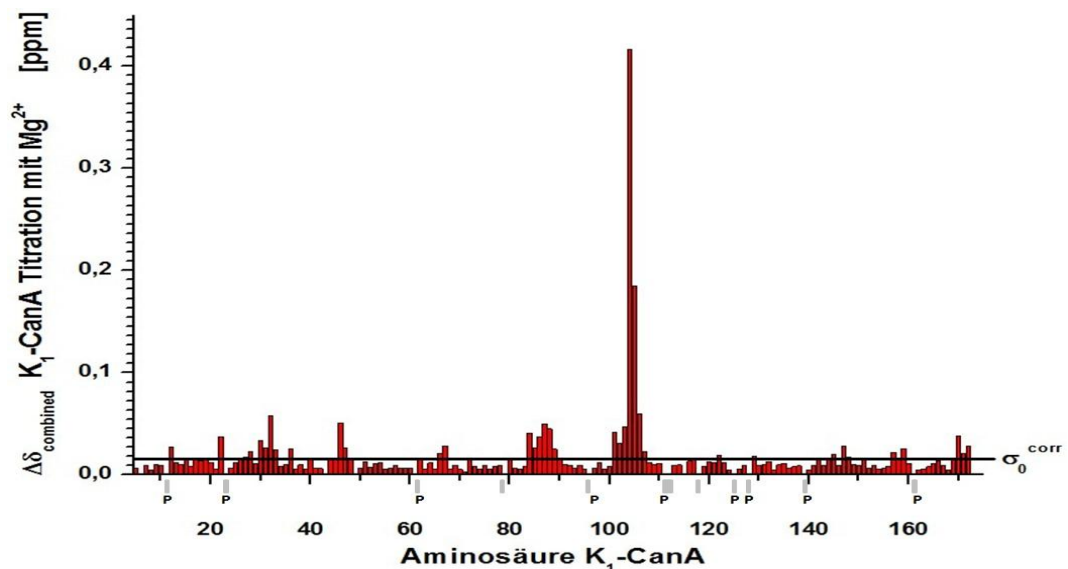


Abbildung 4.37: Balkendiagramm der kombinierten chemischen Verschiebungen aufgetragen gegen die Positionen der Aminosäuren von K₁-CanA bei der Titration mit 12.8 mM MgCl₂. Die kombinierten chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{\text{combined shift}}$) wurden anhand der **Formel 3.12** mit ¹⁵N-gelabeltem K₁-CanA (c (K₁-CanA) = 0.17 mM) bei 323 K berechnet. Die korrigierte Standardabweichung zu Null $\sigma_0^{\text{corr}} = 0.017$ (**schwarze Linie**) wurde nach der *Methode von Schumann* [13] berechnet. In **grau** wurden diejenigen Aminosäuren unterlegt, die nicht zuordenbar waren (T79, Y111, T118, sowie alle Proline - mit **P** gekennzeichnet).

Die Titration von K₁-CanA mit Ca²⁺ ergab mögliche Bindungsstellen in der Umgebung der Aminosäuren **T22, S30, D46, E86, K104** und **V171**. Die Titration von K₁-CanA mit Mg²⁺ ergab mögliche Bindungsstellen in der Umgebung der Aminosäuren **I12, T22, D32, D46, E86, K104** und **V171**.

Aufgrund des geringen Konzentrationsunterschiedes der Protein-Proben wurde bei CanA (bei gleicher Vorgehensweise wie bei K₁-CanA, mit der Verdopplung der Salzkonzentration) ein anderes Protein-Salzkonzentration-Verhältnis erreicht. CaCl₂ wurde ab einem Verhältnis von 1 : 0.4 (c (CaCl₂) = 0.05 mM) bis zu einem Verhältnis von 1 : 53 (c (CaCl₂) = 6.4 mM) hinzutitriert.

Die Titration von Ca²⁺ bzw. Mg²⁺ führte bei CanA zu der erwähnten induzierten Polymerisation und somit zum kontinuierlichen Ausfall des Proteins. Dies wird insbesondere an dem starken Abfall des Signal zu Rauschen Verhältnisses der HSQC-Spektren mit zunehmender Messzeit bzw. Salzkonzentration deutlich. Diesbezüglich konnten die Messreihen bei CanA nicht bis zur vollständigen Sättigung der Bindungsstellen durch die zweiwertigen Kationen durchgeführt werden. Durch die Verkürzungen der Messzeiten durch die Einführung von *sofast*-HMQCs war es jedoch möglich, die Titration von CanA bis zur annähernden Sättigung zu verfolgen.

Der weitere Polymerisationsverlauf bis zur Sättigungskonzentration von CaCl₂ wurde über mehrere Stunden weiter verfolgt. Ab einem Verhältnis von 1 : 53 (c (CaCl₂) = 6.4 mM) erreichen die Bindungsstellen von CanA (wie das nicht zur Polymerisierung fähige Konstrukt K₁-CanA) weitestgehend ihre Sättigung für Ca²⁺. Die **Abbildung 4.38** zeigt die Änderungen der chemischen Verschiebungen der NMR-Signale in einem ¹⁵N-HSQC, in Abwesenheit (**blau**) und in Anwesenheit (**rot**) von CaCl₂ (Verhältnis CanA:CaCl₂ = 1 : 53; c (CaCl₂) = 6.4 mM).

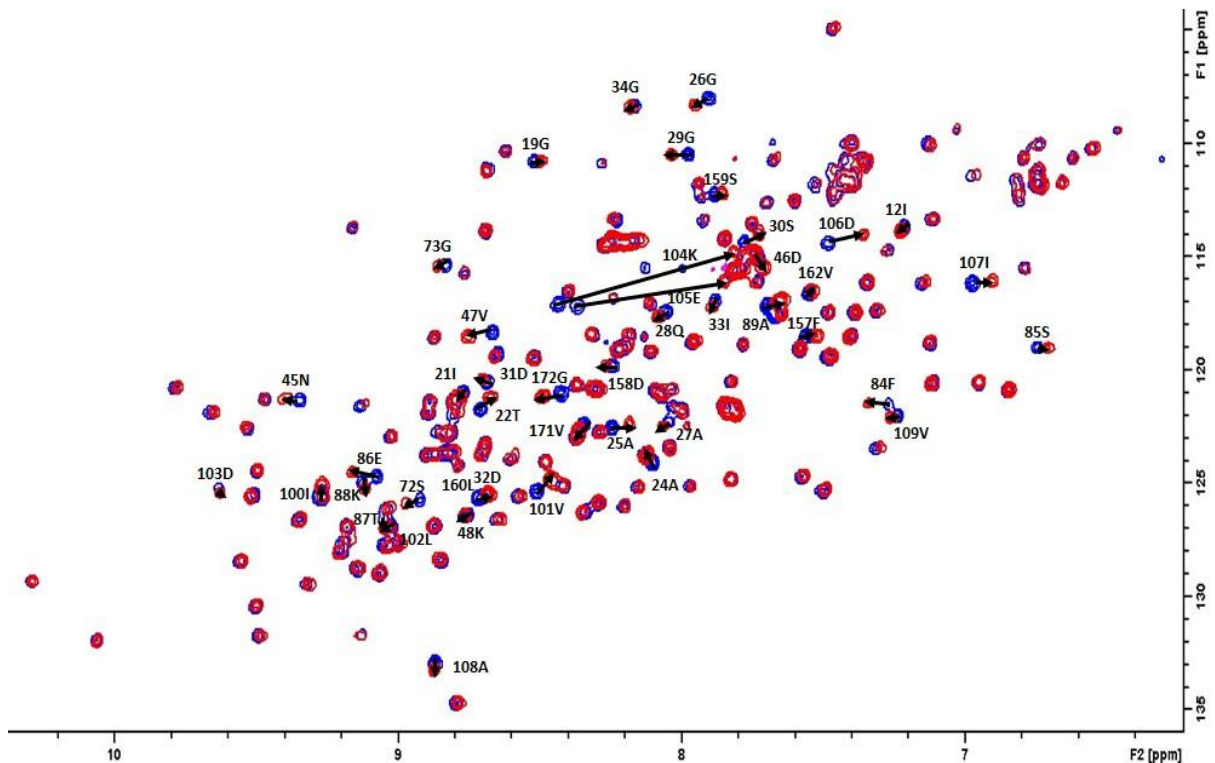


Abbildung 4.38: (^1H - ^{15}N)-soft-HMQC von CanA ($c = 0.12 \text{ mM}$) in Abwesenheit (**blau**) und in Anwesenheit (**rot**) von CaCl_2 im Verhältnis 1 : 53 ($c(\text{CaCl}_2) = 6.4 \text{ mM}$) bei 323 K (50 mM TRIS/HCl, pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O , 0.4 mM DSS, Spektrometer = 800 MHz)

MgCl_2 wurde ab einem Verhältnis von 1 : 0.6 ($c(\text{MgCl}_2) = 0.1 \text{ mM}$) bis zu einem Verhältnis von 1 : 106 ($c(\text{MgCl}_2) = 51.2 \text{ mM}$) zu CanA titriert. Bei einem Verhältnis von 1 : 106 ($c(\text{MgCl}_2) = 12.8 \text{ mM}$) erreichen die Bindungsstellen von CanA weitestgehend ihre Sättigung für Mg^{2+} . Danach verschieben sich alle NMR-Signale äquivalent zur zunehmenden Salzkonzentration. Die **Abbildung 4.39** zeigt die Änderungen der chemischen Verschiebungen der NMR-Signale in einem ^{15}N -HSQC, in Abwesenheit (**blau**) und in Anwesenheit (**rot**) von MgCl_2 (Verhältnis $\text{K}_1\text{-CanA} : \text{MgCl}_2 = 1 : 106$; $c(\text{MgCl}_2) = 12.8 \text{ mM}$). Die NMR-Signale verschieben sich zwar proportional gleichmäßig im Bezug zur Titration mit CaCl_2 , jedoch im weitaus geringerem Maße.

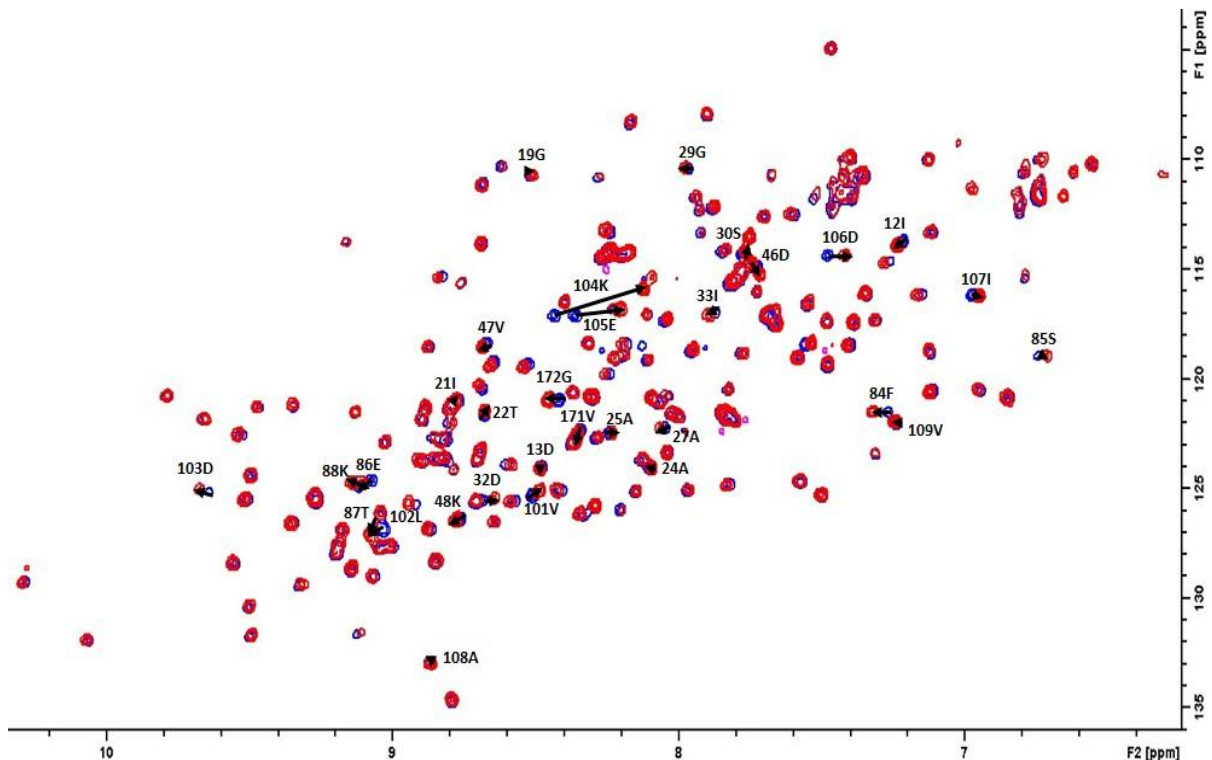


Abbildung 4.39: (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQC von CanA ($c = 0.12 \text{ mM}$) in Abwesenheit (blau) und in Anwesenheit (rot) von MgCl_2 im Verhältnis 1 : 106 ($c(\text{MgCl}_2) = 12.8 \text{ mM}$) bei 323 K (50 mM TRIS/HCl, pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O , 0.4 mM DSS, Spektrometer = 800 MHz)

Die Titrations des zur Polymerisierung fähigen CanA ergaben ebenfalls die eindeutige Bindungsstelle für Ca^{2+} und Mg^{2+} um die Aminosäure **K104** und **E105** wie bei K_1 -CanA (**Abbildung 4.40** und **Abbildung 4.41**). Zur besseren Veranschaulichung wurde die Skala in **Abbildung 4.41** gegenüber **Abbildung 4.40** zweifach vergrößert dargestellt.

Bei der Titration von CanA mit Ca^{2+} erreicht $\Delta\delta_{\text{combined}}$ von **K104** einen Wert von 0.81 ppm und **E105** einen Wert von 0.59 ppm mit einem $\sigma_{\text{o}}^{\text{corr}}$ von 0.022. Bei der Titration mit Mg^{2+} erreicht $\Delta\delta_{\text{combined}}$ von **K104** nur einen Wert von 0.41 ppm und **E105** einen Wert von 0.18 ppm mit einem $\sigma_{\text{o}}^{\text{corr}}$ von 0.018.

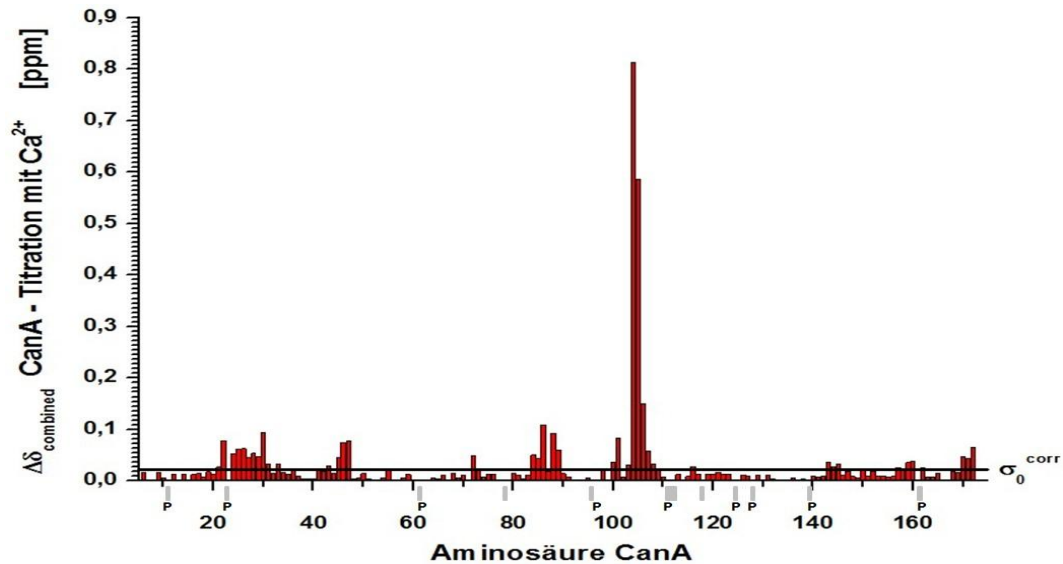


Abbildung 4.40: Balkendiagramm der kombinierten chemischen Verschiebungen aufgetragen gegen die Positionen der Aminosäuren von CanA bei der Titration mit 6.4 mM CaCl_2 . Die kombinierten chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{\text{combined shift}}$) wurden anhand der **Formel 3.12** mit ^{15}N -gelabeltem CanA ($c(\text{CanA}) = 0.12 \text{ mM}$) bei 323 K berechnet. Die korrigierte Standardabweichung zu Null $\sigma_0^{\text{corr}} = 0.022$ (**schwarze Linie**) wurde nach der *Methode von Schumann* [13] berechnet. In **grau** wurden diejenigen Aminosäuren unterlegt, die nicht zuordenbar waren (T79, Y111, T118, sowie alle Proline - mit **P** gekennzeichnet).

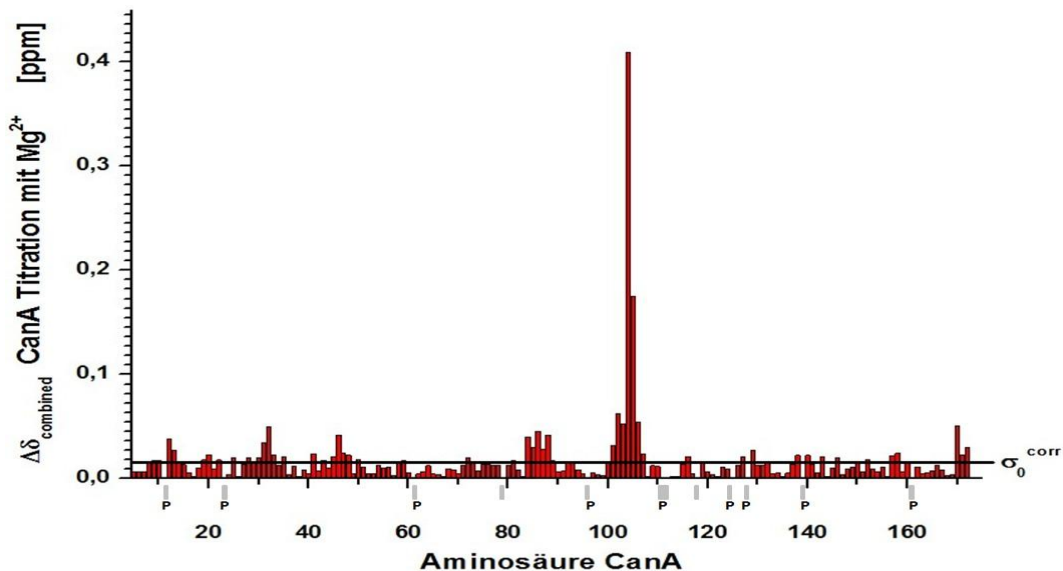


Abbildung 4.41: Balkendiagramm der kombinierten chemischen Verschiebungen aufgetragen gegen die Positionen der Aminosäuren von CanA bei der Titration mit 12.8 mM MgCl_2 . Die kombinierten chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{\text{combined shift}}$) wurden anhand der **Formel 3.12** mit ^{15}N -gelabeltem CanA ($c(\text{CanA}) = 0.12 \text{ mM}$) bei 323 K berechnet. Die korrigierte Standardabweichung zu Null $\sigma_0^{\text{corr}} = 0.018$ (**schwarze Linie**) wurde nach der *Methode von Schumann* [13] berechnet. In **grau** wurden diejenigen Aminosäuren unterlegt, die nicht zuordenbar waren (T79, Y111, T118, sowie alle Proline - mit **P** gekennzeichnet).

Die Titration von CanA mit Ca^{2+} ergab mögliche Bindungsstellen in der Umgebung der Aminosäuren **T22**, **S30**, **D46**, **E86**, **K104** und **V171**. Die Titration von $\text{K}_1\text{-CanA}$ mit Mg^{2+} ergab mögliche Bindungsstellen in der Umgebung der Aminosäuren **I12**, **D32**, **D46**, **E86**, **K104** und **V171**.

Die Proteine $\text{K}_1\text{-CanA}$ und CanA besitzen somit vermutlich identische Bindungszentren mit nahezu vollkommen identischen $\Delta\delta_{\text{combined}}$ Werten.

4.11.1.2 Berechnung der Bindungskonstanten von CanA und $\text{K}_1\text{-CanA}$ für Ca^{2+} und Mg^{2+}

Zur Bestimmung der Affinität von $\text{K}_1\text{-CanA}$ und CanA gegenüber Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} wurde eine Schrittweise Titration von CaCl_2 bzw. MgCl_2 zu $\text{K}_1\text{-CanA}$ bzw. CanA durchgeführt und der Titrationsverlauf über $(^1\text{H}\text{-}^{15}\text{N})\text{-sofast-HMQC}$ -Experimente dokumentiert. Über den Titrationsverlauf lassen sich die jeweiligen Bindungskonstanten (wie in **Kapitel 3.2.4.4** beschrieben) berechnen. Mit dem Programm Origin wurden die chemischen Verschiebungen ($^1\text{H}^{\text{N}}$, $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ und die kombinierte chemische Verschiebung aus $^1\text{H}^{\text{N}}$ und $^{15}\text{N}^{\text{H}}$) der Aminosäuren, welche bei der Bestimmung der Bindungsstellen eine signifikante Überschreitung von $\sigma_{\text{o}}^{\text{corr}}$ aufwiesen, gegen die zu titrierte CaCl_2 bzw. MgCl_2 Konzentration aufgetragen. Die Berechnung der Bindungskonstanten K_{D} der Aminosäuren erfolgte durch die Fittung der Messdaten über die **Formel 3.15**.

Zur Absicherung der Bindungskonstanten der möglichen Bindungszentren wurden bei der Titration beider Proteine mit CaCl_2 die Bindungskonstanten der Aminosäuren T22 und V101 zusätzlich berechnet.

Die **Abbildung 4.42** zeigt hierbei die Auftragung der chemischen Verschiebung $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ von $\text{K}_1\text{-CanA}$ gegen $c(\text{Ca}^{2+})$, die **Abbildung 4.43** die Auftragung der chemischen Verschiebung $^1\text{H}^{\text{N}}$ von $\text{K}_1\text{-CanA}$ gegen $c(\text{Ca}^{2+})$ und die **Abbildung 4.44** die Auftragung der kombinierten chemischen Verschiebung $^1\text{H}^{\text{N}}$ und $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ von $\text{K}_1\text{-CanA}$ gegen $c(\text{Ca}^{2+})$.

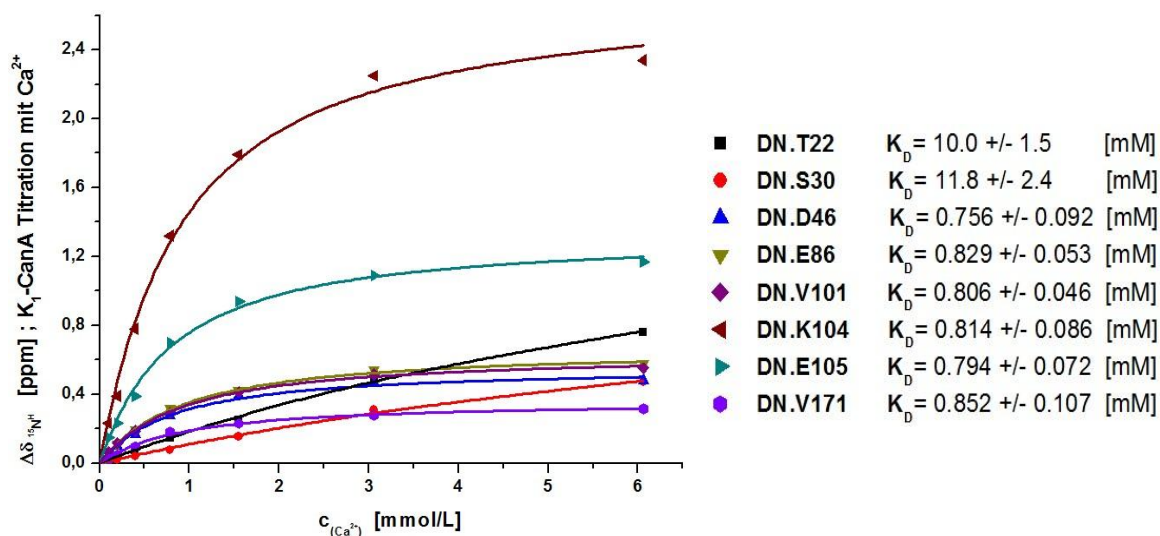


Abbildung 4.42: $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ von $\text{K}_1\text{-CanA}$ mit CaCl_2 : Plot der chemischen Verschiebungen $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ der Bindungszentren von $\text{K}_1\text{-CanA}$ bei der Titration mit CaCl_2 ; (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQCs bei 323 K; $c(\text{K}_1\text{-CanA}) = 0.17 \text{ mM}$, 50 mM TRIS/HCL pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O und 0.4 mM DSS.

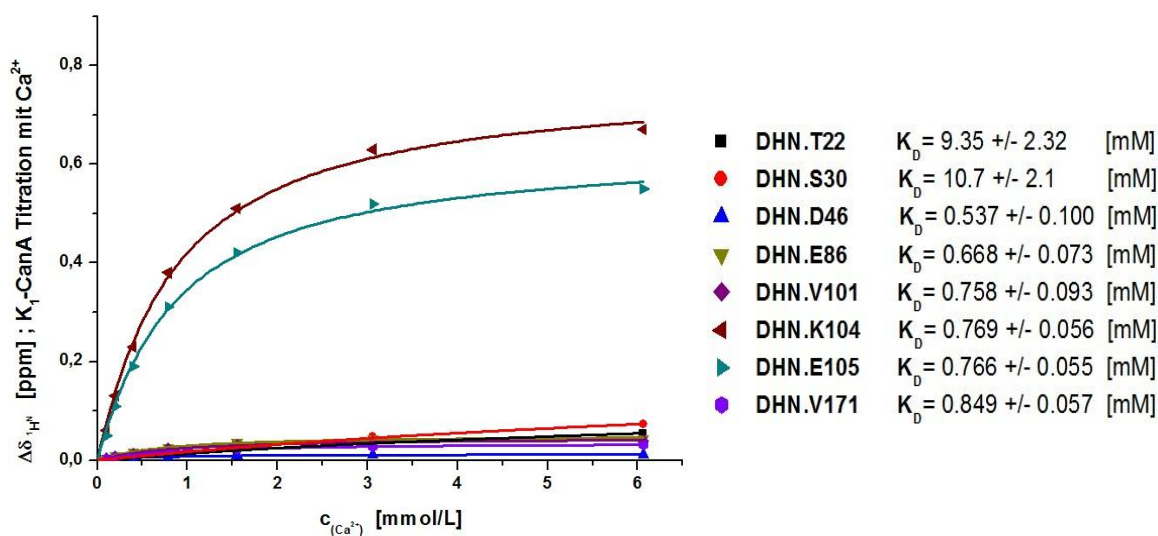


Abbildung 4.43: $^1\text{H}^{\text{N}}$ von $\text{K}_1\text{-CanA}$ mit CaCl_2 : Plot der chemischen Verschiebungen $^1\text{H}^{\text{N}}$ der Bindungszentren von $\text{K}_1\text{-CanA}$ bei der Titration mit CaCl_2 ; (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQCs bei 323 K; $c(\text{K}_1\text{-CanA}) = 0.17 \text{ mM}$, 50 mM TRIS/HCL pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O und 0.4 mM DSS.

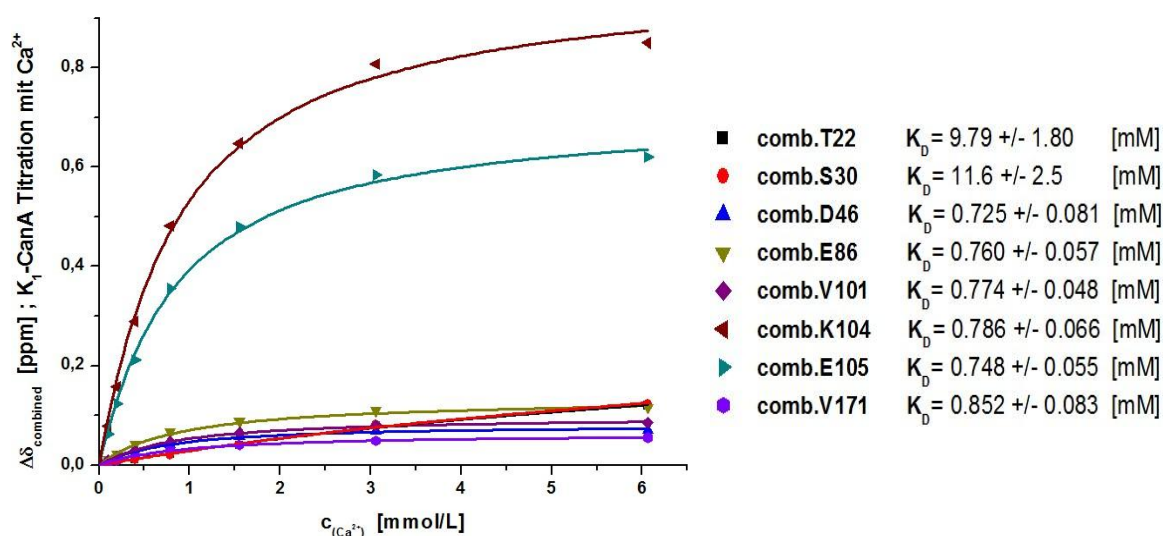


Abbildung 4.44: $^1\text{H}^{\text{N}}$ und $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ von $\text{K}_1\text{-CanA}$ mit CaCl_2 : Plot der kombinierten chemischen Verschiebungen $^1\text{H}^{\text{N}}$ und $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ der Bindungszentren von $\text{K}_1\text{-CanA}$ bei der Titration mit CaCl_2 ; (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQCs bei 323 K; $c(\text{K}_1\text{-CanA}) = 0.17 \text{ mM}$, 50 mM TRIS/HCL pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O und 0.4 mM DSS.

Der Vergleich der Bindungskonstanten der einzelnen Aminosäuren von $\text{K}_1\text{-CanA}$ für Ca^{2+} legt die Vermutung nahe, dass die Aminosäuren **D46, E86, V101, K104, E105, V171** und ihre direkten Nachbarn um eine sehr selektive Calcium-Bindungsstelle 1 (im weiteren Verlauf **CaBS1** genannt) und die Aminosäuren **T22, S30** und ihre direkten Nachbarn um eine weitere, zweite, weniger selektive Calcium-Bindungsstelle 2 (im weiteren Verlauf **CaBS2** genannt) gruppiert liegen müssen.

Die Bestimmung der Bindungskonstante K_D und ihres Fehlerbereichs Δx des jeweiligen Ca^{2+} -Bindungszentrums bei $\text{K}_1\text{-CanA}$, wurde wie in **Kapitel 3.2.4.4** beschrieben durchgeführt. Da der zweiseitige **t-Test** nur bei mehreren Messpunkten Gültigkeit hat, wurde für das Bindungszentrum **CaBS2** der gemittelte Fehlerbereich der Fitkurven aus Origin herangezogen.

$$K_D(\text{K}_1\text{-CanA}; \text{CaBS1}) = 0.774 \pm 0.046 \text{ mM}$$

$$K_D(\text{K}_1\text{-CanA}; \text{CaBS2}) = 10.7 \pm 2.2 \text{ mM}$$

Die **Abbildung 4.45** zeigt die Auftragung der chemischen Verschiebung $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ von CanA gegen $c(\text{Ca}^{2+})$, die **Abbildung 4.46** die Auftragung der chemischen Verschiebung $^1\text{H}^{\text{N}}$ von CanA gegen $c(\text{Ca}^{2+})$ und die **Abbildung 4.47** die Auftragung der kombinierten chemischen Verschiebung $^1\text{H}^{\text{N}}$ und ^{15}N von CanA gegen $c(\text{Ca}^{2+})$.

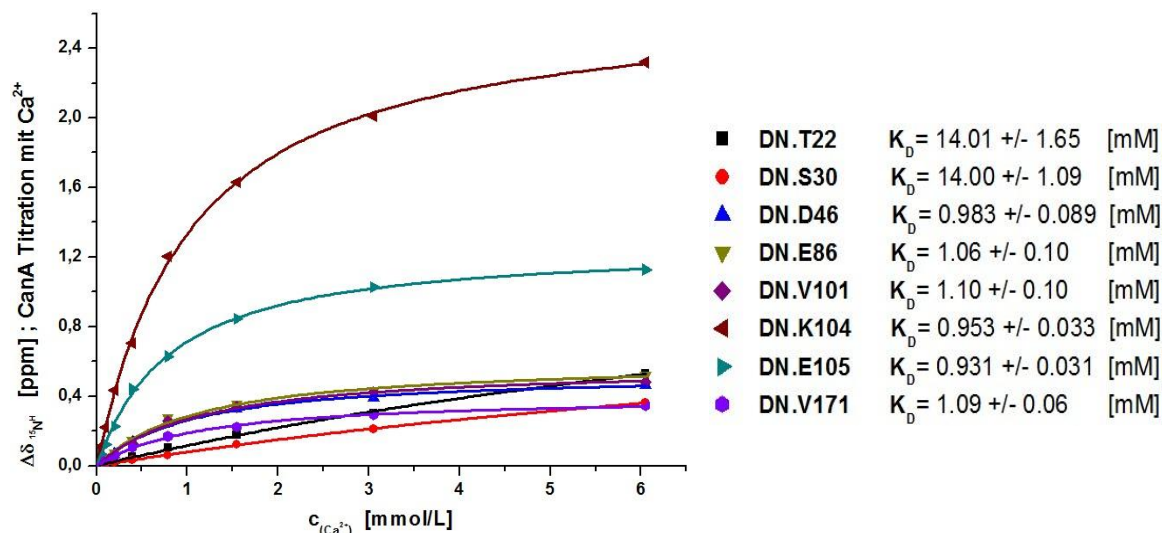


Abbildung 4.45: $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ von CanA mit CaCl_2 : Plot der chemischen Verschiebungen $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ der Bindungszentren von CanA bei der Titration mit CaCl_2 ; (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQCs bei 323 K; $c(\text{CanA}) = 0.12 \text{ mM}$, 50 mM TRIS/HCL pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O und 0.4 mM DSS.

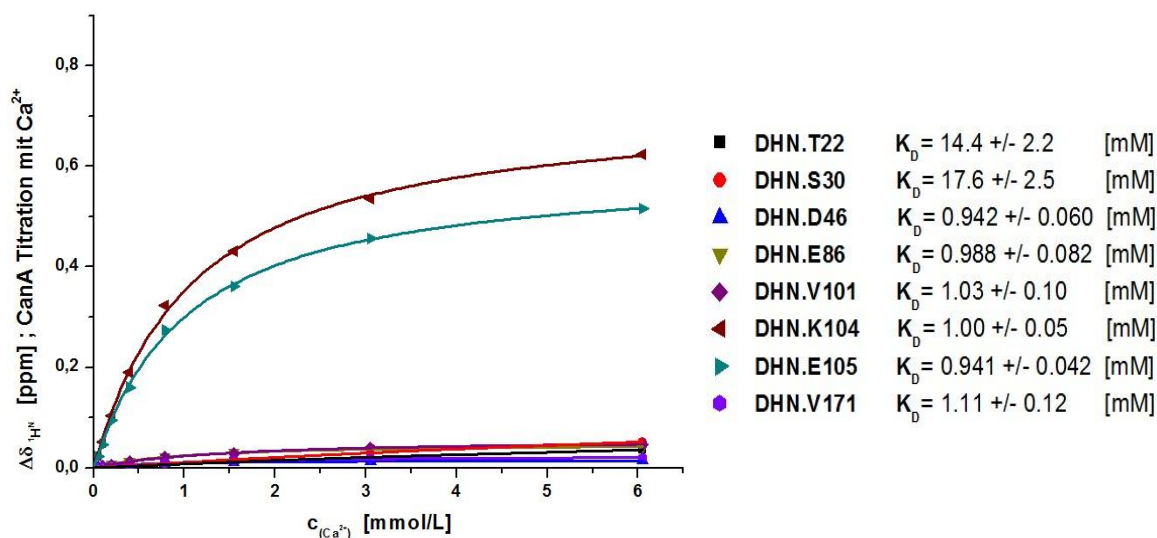


Abbildung 4.46: $^1\text{H}^{\text{N}}$ von CanA mit CaCl_2 : Plot der chemischen Verschiebungen $^1\text{H}^{\text{N}}$ der Bindungszentren von CanA bei der Titration mit CaCl_2 ; (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQCs bei 323 K; $c(\text{CanA}) = 0.12 \text{ mM}$, 50 mM TRIS/HCL pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O und 0.4 mM DSS.

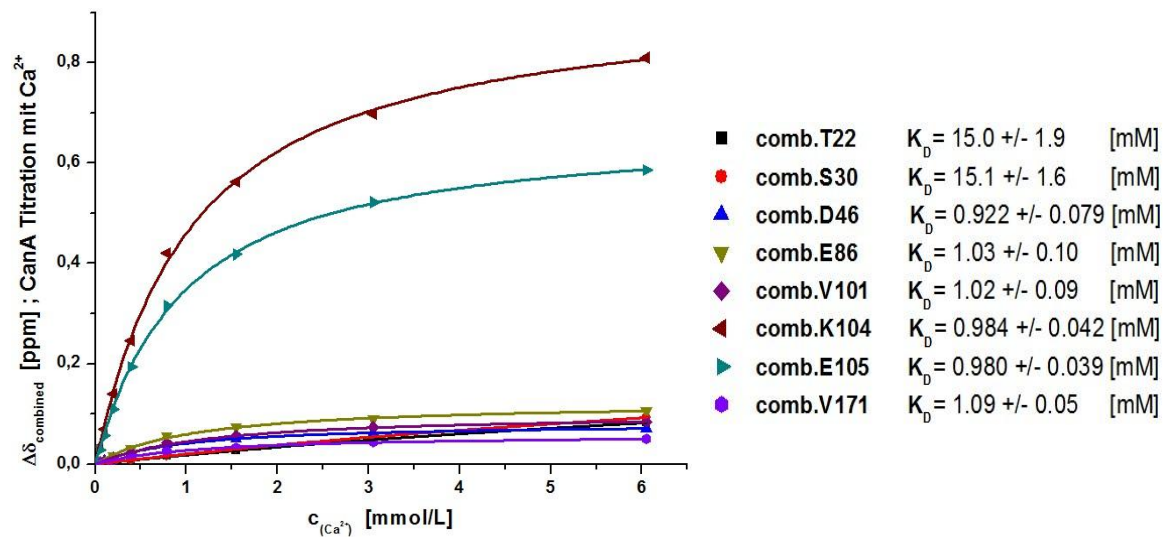


Abbildung 4.47: $^1\text{H}^{\text{N}}$ und $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ von **CanA** mit **CaCl₂**: Plot der kombinierten chemischen Verschiebungen $^1\text{H}^{\text{N}}$ und $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ der Bindungszentren von CanA bei der Titration mit mit **CaCl₂**; (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQCs bei 323 K; $c(\text{CanA}) = 0.12 \text{ mM}$, 50 mM TRIS/HCL pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D₂O und 0.4 mM DSS.

Der Vergleich der Bindungskonstanten der einzelnen Aminosäuren von CanA für Ca^{2+} legt die Vermutung nahe, dass die Aminosäuren **D46**, **E86**, **V101**, **K104**, **E105**, **V171** und ihre direkten Nachbarn um eine sehr selektive Calcium-Bindungsstelle 1 (im weiteren Verlauf **CaBS1** genannt) und die Aminosäuren **T22**, **S30** und ihre direkten Nachbarn um eine weitere, zweite, weniger selektive Calcium-Bindungsstelle 2 (im weiteren Verlauf **CaBS2** genannt) gruppiert liegen müssen.

Die Bestimmung der Bindungskonstante K_D und ihres Fehlerbereichs Δx des jeweiligen Ca^{2+} -Bindungszentrums bei CanA, wurde wie in **Kapitel 3.2.4.4** beschrieben durchgeführt. Da der zweiseitige **t-Test** nur bei mehreren Messpunkten Gültigkeit hat, wurde für das Bindungszentrum **CaBS2** der gemittelte Fehlerbereich der Fitkurven aus Origin herangezogen.

$$K_D(\text{CanA}; \text{CaBS1}) = 1.00 \pm 0.06 \text{ mM}$$

$$K_D(\text{CanA}; \text{CaBS2}) = 15.1 \pm 1.8 \text{ mM}$$

Die Proteine K₁-CanA und CanA besitzen gegenüber Ca²⁺ somit identische Bindungszentren mit nahezu völlig gleichen Bindungskonstanten (K_D (K₁-CanA; CaBS1) = 0.774 +/- 0.046 mM und K_D (K₁-CanA; CaBS2) = 10.7 +/- 2.2 mM; K_D (CanA; CaBS1) = 1.00 +/- 0.06 mM und K_D (CanA; CaBS2) = 15.1 +/- 1.8 mM). Die minimal schlechteren Bindungskonstanten von CanA gegenüber K₁-CanA könnten auf die Polymerisierungsfähigkeit von CanA und somit auf einer Abnahme der Proteinkonzentration im Verlauf der Messung zurückzuführen sein.

Die **Abbildung 4.48** zeigt hierbei die Auftragung der chemischen Verschiebung ¹⁵N^H von K₁-CanA gegen c (Mg²⁺), die **Abbildung 4.64** die Auftragung der chemischen Verschiebung ¹H^N von K₁-CanA gegen c (Mg²⁺) und die **Abbildung 4.50** die Auftragung der kombinierten chemischen Verschiebung ¹H^N und ¹⁵N von K₁-CanA gegen c (Mg²⁺). Bei der Titration mit MgCl₂ wurde aufgrund der maximalen chemischen Verschiebung im jeweiligen Bindungsstellenbereich anstatt den Bindungskonstanten der Aminosäuren **T22** und **S30** die Bindungskonstante der Aminosäure **D32** berechnet. Aufgrund der direkten Nachbarschaft von **V101** zu **K104**, wurde die Berechnung der Bindungskonstante von **V101** bei der Titration mit MgCl₂ nicht mehr berücksichtigt.

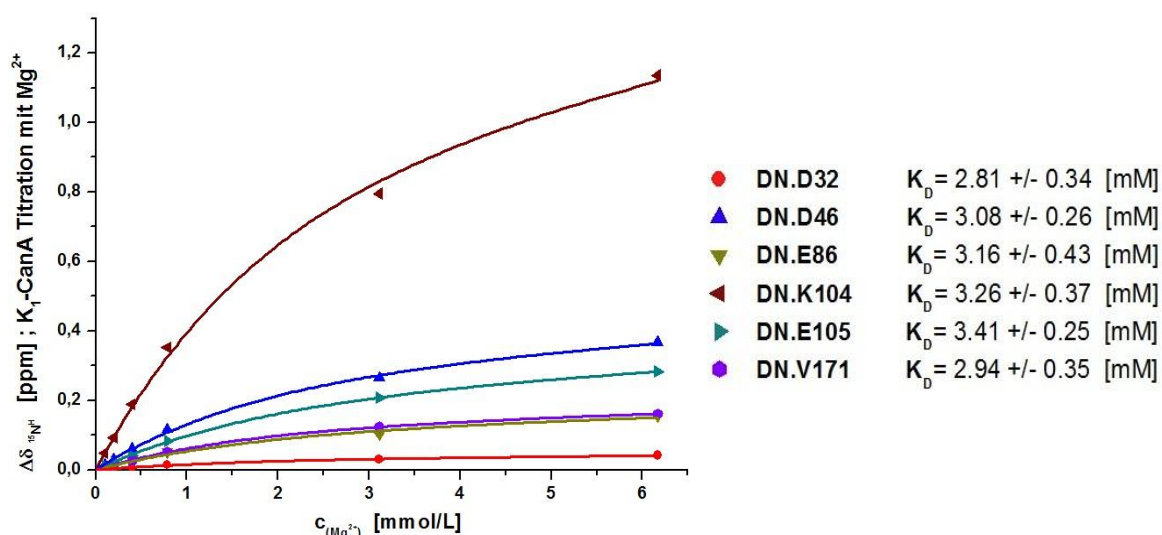


Abbildung 4.48: ¹⁵N^H von K₁-CanA mit MgCl₂: Plot der chemischen Verschiebungen ¹⁵N^H der Bindungszentren von K₁-CanA bei der Titration mit MgCl₂; (¹H-¹⁵N)-sofast-HMQCs bei 323 K; c (K₁-CanA) = 0.17 mM, 50 mM TRIS/HCL pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D₂O und 0.4 mM DSS.

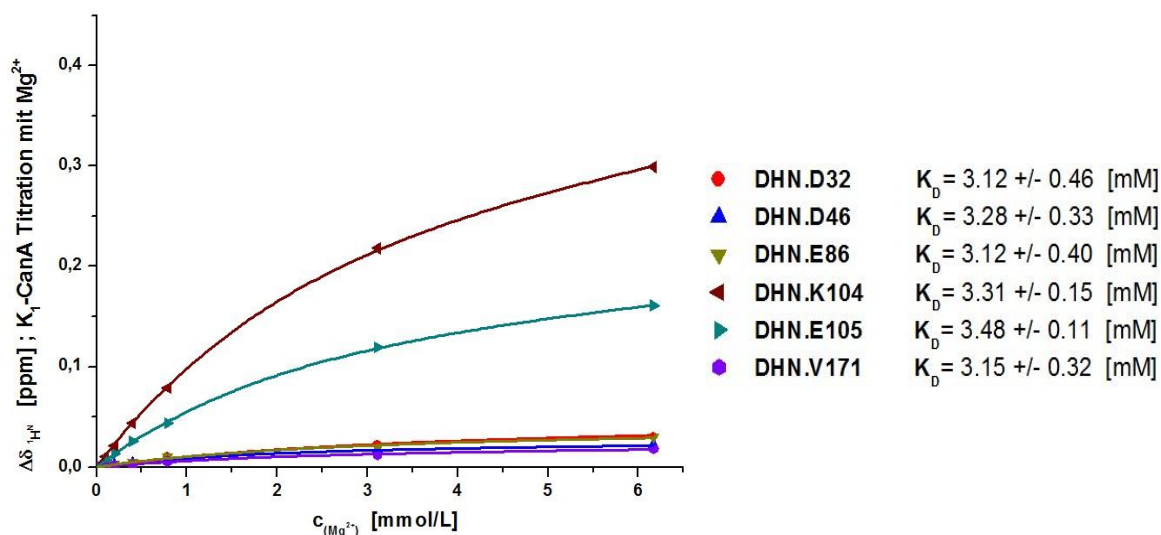


Abbildung 4.49: $^1\text{H}^{\text{N}}$ von $\text{K}_1\text{-CanA}$ mit MgCl_2 : Plot der chemischen Verschiebungen $^1\text{H}^{\text{N}}$ der Bindungszentren von $\text{K}_1\text{-CanA}$ bei der Titration mit MgCl_2 ; (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQCs bei 323 K; $c(\text{K}_1\text{-CanA}) = 0.17 \text{ mM}$, 50 mM TRIS/HCL pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O und 0.4 mM DSS.

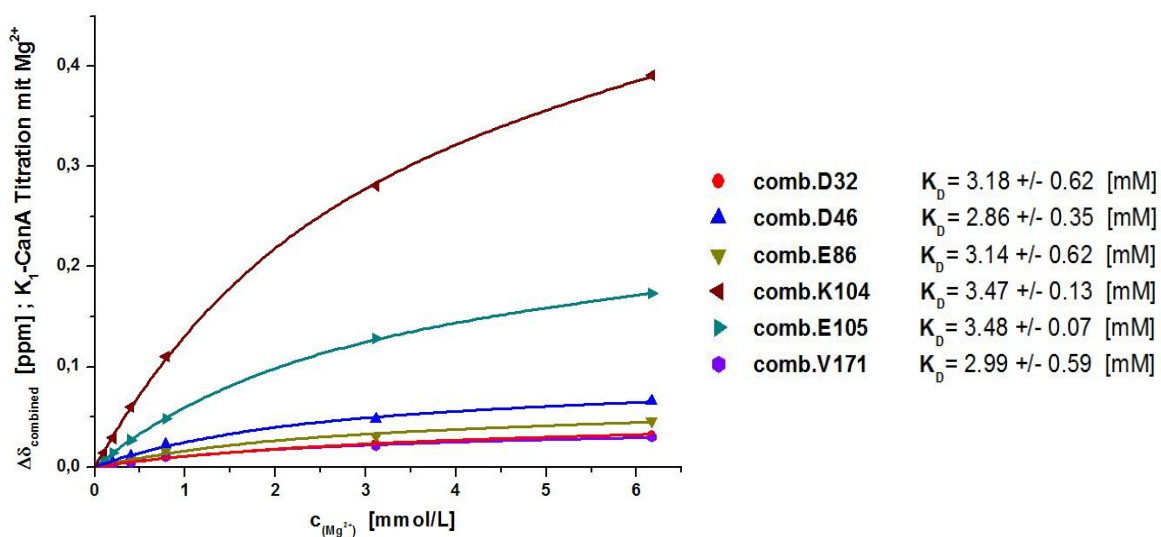


Abbildung 4.50: $^1\text{H}^{\text{N}}$ und $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ von $\text{K}_1\text{-CanA}$ mit MgCl_2 : Plot der kombinierten chemischen Verschiebungen $^1\text{H}^{\text{N}}$ und $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ der Bindungszentren von $\text{K}_1\text{-CanA}$ bei der Titration mit MgCl_2 ; (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQCs bei 323 K; $c(\text{K}_1\text{-CanA}) = 0.17 \text{ mM}$, 50 mM TRIS/HCL pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O und 0.4 mM DSS.

Der Vergleich der Bindungskonstanten der einzelnen Aminosäuren von $\text{K}_1\text{-CanA}$ für Mg^{2+} legt die Vermutung nahe, dass die Aminosäuren **D32**, **D46**, **E86**, **K104**, **E105**, **V171** und ihre direkten Nachbarn nur eine Magnesium-Bindungsstelle mit gleicher

Affinität besitzen müssen. Aufgrund der Erkenntnisse aus der Titration mit CaCl_2 und den späteren Strukturanalysen können jedoch zwei Bindungszentren mit gleicher Affinität für Mg^{2+} angenommen werden. Das Bindungszentrum um die Aminosäuren **D46**, **E86**, **K104** und **E105** wird im Folgenden **MgBS1** und das Zentrum um die Aminosäure **D32** **MgBS2** genannt.

Die Bestimmung der Bindungskonstante K_D und ihres Fehlerbereichs Δx des jeweiligen Mg^{2+} -Bindungszentrums bei K_1 -CanA, wurde wie in **Kapitel 3.2.4.4** beschrieben durchgeführt. Da der zweiseitige **t-Test** nur bei mehreren Messpunkten Gültigkeit hat, wurde für das Bindungszentrum **MgBS2** der Fehlerbereich der Fitkurve aus Origin herangezogen.

$$K_D(K_1\text{-CanA; MgBS1}) = 3.19 \pm 0.35 \text{ mM}$$

$$K_D(K_1\text{-CanA; MgBS2}) = 3.18 \pm 0.62 \text{ mM}$$

Die **Abbildung 4.51** zeigt die Auftragung der chemischen Verschiebung $^{15}\text{N}^H$ von CanA gegen $c(\text{Mg}^{2+})$, die **Abbildung 4.52** die Auftragung der chemischen Verschiebung $^1\text{H}^N$ von CanA gegen $c(\text{Ca}^{2+})$ und die **Abbildung 4.53** die Auftragung der kombinierten chemischen Verschiebung $^1\text{H}^N$ und ^{15}N von CanA gegen $c(\text{Mg}^{2+})$.

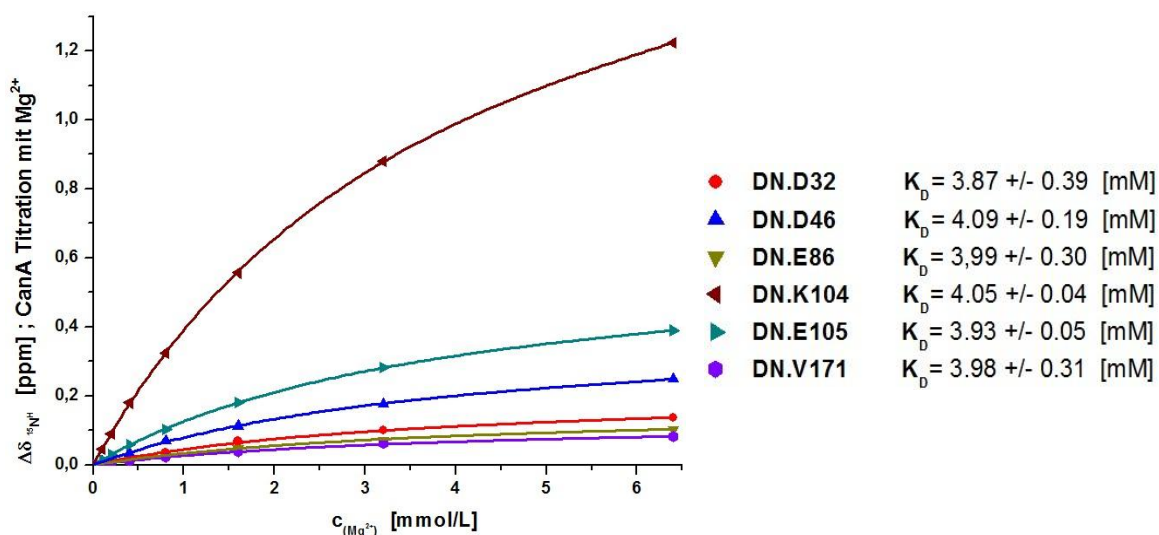


Abbildung 4.51: $^{15}\text{N}^H$ von CanA mit MgCl_2 : Plot der chemischen Verschiebungen $^{15}\text{N}^H$ der Bindungszentren von CanA bei der Titration mit MgCl_2 ; (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQCs bei 323 K; $c(\text{CanA}) = 0.12 \text{ mM}$, 50 mM TRIS/HCL pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O und 0.4 mM DSS.

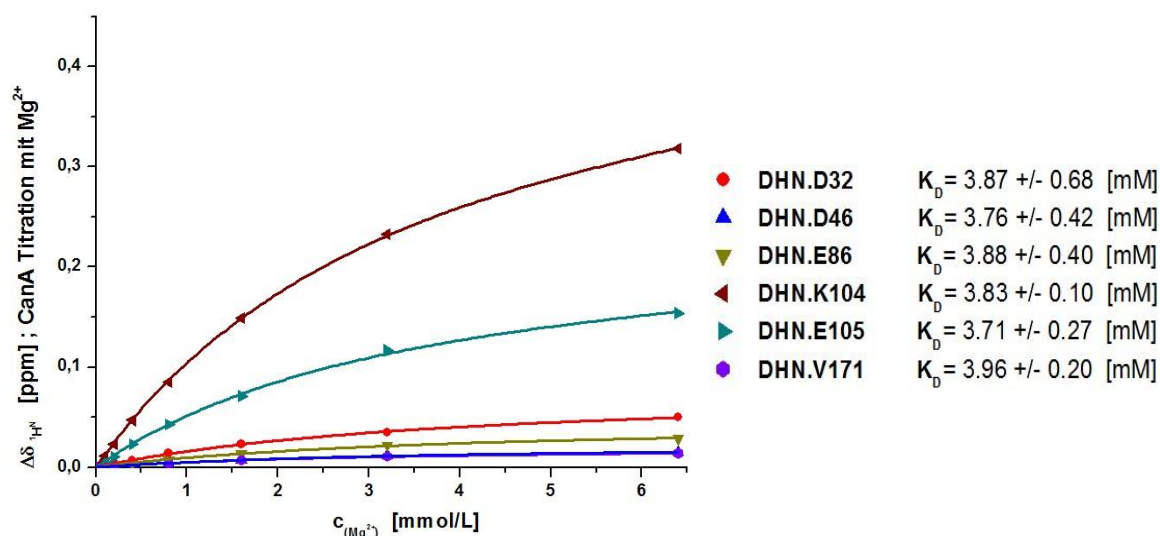


Abbildung 4.52: $^1\text{H}^{\text{N}}$ von **CanA** mit **MgCl₂**: Plot der chemischen Verschiebungen $^1\text{H}^{\text{N}}$ der Bindungszentren von CanA bei der Titration mit MgCl₂; (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQCs bei 323 K; $c(\text{CanA}) = 0.12 \text{ mM}$, 50 mM TRIS/HCL pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D₂O und 0.4 mM DSS.

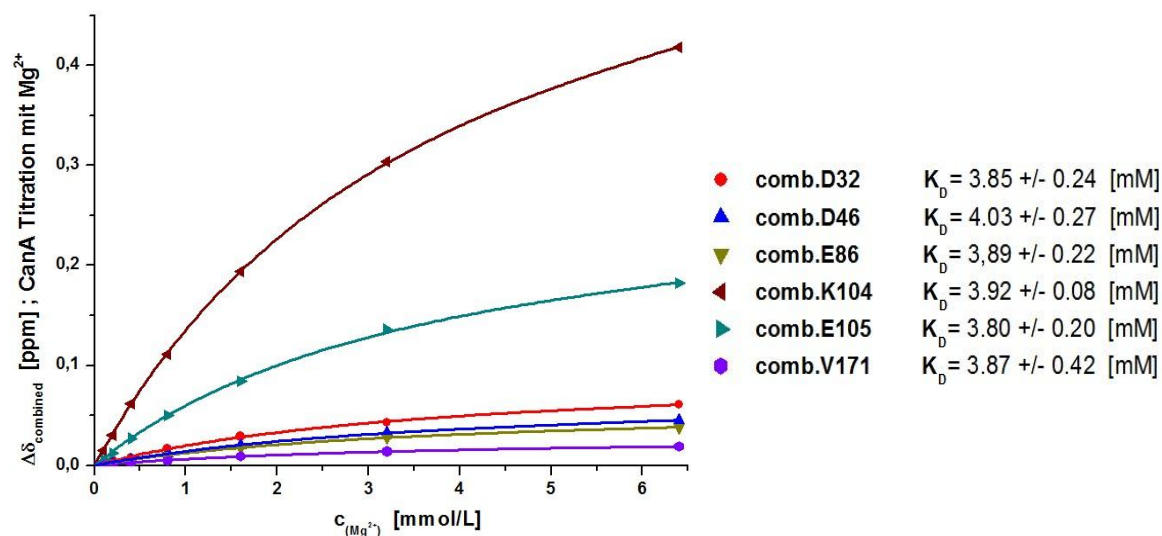


Abbildung 4.53: $^1\text{H}^{\text{N}}$ und $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ von **CanA** mit **MgCl₂**: Plot der kombinierten chemischen Verschiebungen $^1\text{H}^{\text{N}}$ und $^{15}\text{N}^{\text{H}}$ der Bindungszentren von CanA bei der Titration mit MgCl₂; (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQCs bei 323 K; $c(\text{CanA}) = 0.12 \text{ mM}$, 50 mM TRIS/HCL pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D₂O und 0.4 mM DSS.

Der Vergleich der Bindungskonstanten der einzelnen Aminosäuren von CanA für Mg^{2+} legt die Vermutung nahe, dass die Aminosäuren **D32**, **D46**, **E86**, **K104**, **E105**,

V171 und ihre direkten Nachbarn eine Magnesium-Bindungsstelle mit gleicher Affinität besitzen müssen. Aufgrund der Erkenntnisse aus der Titration mit CaCl_2 und den späteren Strukturanalysen können jedoch zwei Bindungszentren mit gleicher Affinität für Mg^{2+} angenommen werden. Das Bindungszentrum um die Aminosäuren **D46**, **E86**, **K104** und **E105** wird im Folgenden **MgBS1** und das Zentrum um die Aminosäure **D32** **MgBS2** genannt.

Die Bestimmung der Bindungskonstante K_D und ihres Fehlerbereichs Δx des jeweiligen Mg^{2+} -Bindungszentrums bei CanA, wurde wie in **Kapitel 3.2.4.4** beschrieben durchgeführt. Da der zweiseitige **t-Test** nur bei mehreren Messpunkten Gültigkeit hat, wurde für das Bindungszentrum **MgBS2** der Fehlerbereich der Fitkurve aus Origin herangezogen.

$$K_D(\text{CanA}; \text{MgBS1}) = 3.90 \pm 0.11 \text{ mM}$$

$$K_D(\text{CanA}; \text{MgBS2}) = 3.85 \pm 0.24 \text{ mM}$$

Die Proteine K_1 -CanA und CanA besitzen gegenüber Mg^{2+} somit identische Bindungszentren mit nahezu gleichen Bindungskonstanten ($K_D(K_1\text{-CanA}; \text{MgBS1}) = 3.19 \pm 0.35 \text{ mM}$ und $K_D(K_1\text{-CanA}; \text{MgBS2}) = 3.18 \pm 0.62 \text{ mM}$; $K_D(\text{CanA}; \text{MgBS1}) = 3.90 \pm 0.11 \text{ mM}$ und $K_D(\text{CanA}; \text{MgBS2}) = 3.85 \pm 0.24 \text{ mM}$). Die minimal schlechteren Bindungskonstanten von CanA gegenüber K_1 -CanA könnten auf die Polymerisierungsfähigkeit von CanA und somit auf einer Abnahme der Proteinkonzentration im Verlauf der Messung zurückzuführen sein. Die Affinität der Bindungszentren **MgBS1** und **MgBS2** gegenüber Mg^{2+} ist gleich groß und liegt innerhalb der Fehlergrenzen.

4.12 Die Eigenpolymerisation von CanA

Das Protein CanA besitzt wie bereits erwähnt die Fähigkeit zur schleichenden Eigenpolymerisation ohne vorausgehende Induktion. Um diesen Vorgang detailliert nachvollziehen zu können, wurde eine ^{15}N markierte CanA Probe, welche über eine längere Zeit bei 313 K inkubierte, mit einer gleich nach der Gelfiltration vermessenen ^{15}N markierten CanA Probe, welche ausschließlich monomeres CanA enthalten

sollte, verglichen. Die Proteinkonzentrationen beider Proben war geringfügig verschieden. Die **Abbildung 4.54** zeigt ein ^1H - ^{15}N -HSQC von CanA unverzüglich aufgenommen nach einer Gelfiltration (blau) bzw. von CanA ca. 100 h nach der Gelfiltration (rot) bei 313 K (600 MHz Spektrometer).

Bei einem direkten Vergleich der Spektren, welche unter identischen Bedingungen vermessen wurden, wird sehr schnell deutlich, dass bestimmte Signale der Aminosäuren des Proteins durch einen längeren zeitlichen Verlauf nach der Gelfiltration an Intensivität verlieren bzw. gänzlich verschwinden. Auffallend dabei ist, dass den größten Volumen- / Intensitätsverlust die ^{15}N Signale erfahren, die dem nicht zugeordneten N-Terminus von CanA entsprechen müssten.

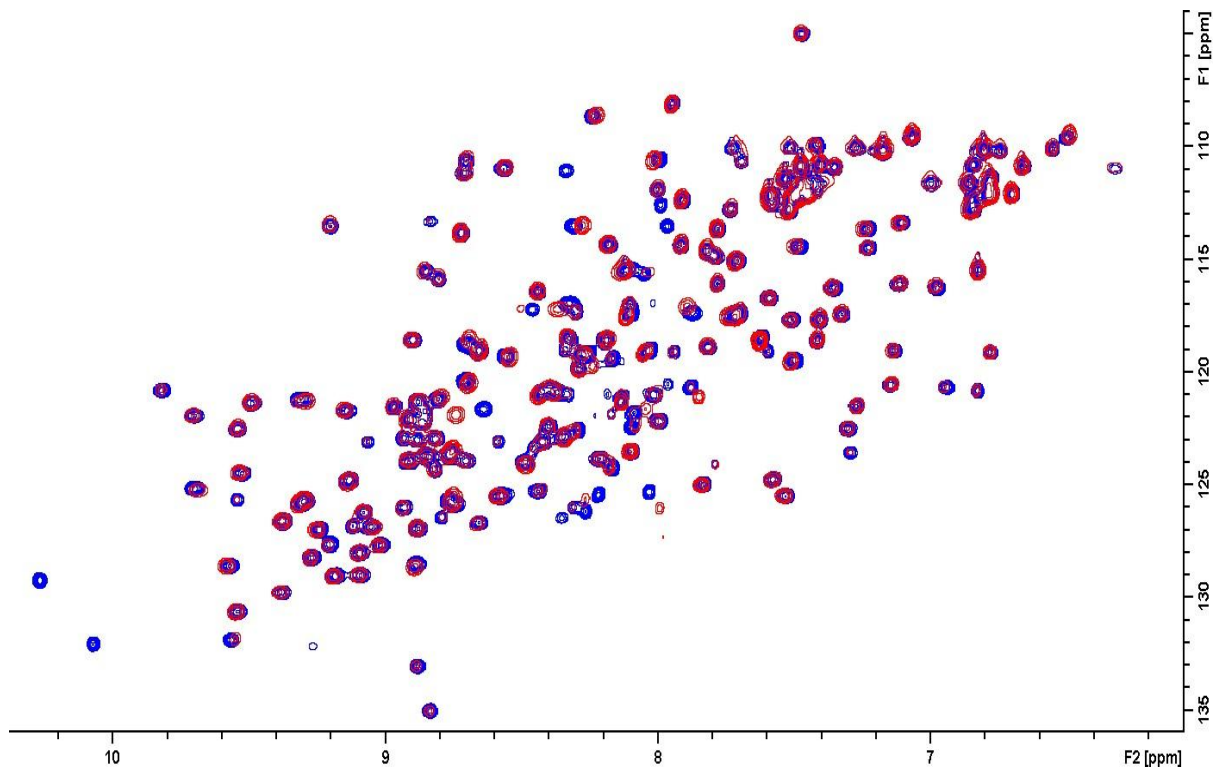


Abbildung 4.54: ^1H - ^{15}N -HSQC von CanA gleich nach einer Gelfiltration (blau) und CanA nach länger zurückliegender Gelfiltration (rot) - ca. 100 h - bei 313 K; c (CanA bzw. K_1 -CanA) = ca. 0.3 mM in 20 mM Phosphatpuffer pH = 6.6, 0.4 mM DSS, 10 % D_2O , Spektrometer = 600 MHz;

Die **Abbildung 4.55** gibt die durch die Eigenpolymerisation auftretende Abnahme der einzelnen ^{15}N -Signal-Intensitäten der Aminosäuren von CanA wieder. Hierbei wurde

die Volumenabnahme jedes Signals durch das dazugehörige Anfangsvolumen geteilt. Da es sich bei diesem Experiment wie bereits erwähnt um zwei unterschiedliche Proben mit nicht völlig äquivalenten Proteinkonzentrationen handelt, ist die prozentuale Volumenabnahme nur qualitativ zu sehen. Die Spektren mussten um einen Volumenskalierungsfaktor von 1.5 angeglichen werden.

Für die weitere Auswertung wurden nur signifikante Volumenänderungen mit einer Volumenabnahme von mehr als dem 1.5 fachen Wert von σ_0^{corr} (= 32%) berücksichtigt. Die Aminosäuren **5A, Q6, A7, A8, A36, T52, A54, T79, A108, V109, A151, G154, L156, V168** erreichten eine signifikante Volumenänderung von mehr als 32% und sind somit mögliche Kontaktpunkte zwischen den Proteinuntereinheiten des Polymers von CanA.

Die Bereiche der Intensitäts- / Volumenabnahme der ^{15}N -Signale bei der Eigenpolymerisation von CanA stimmen zum größten Teil mit der Intensitäts- / Volumenabnahmen der ^{15}N -Signale bei der induzierten Polymerisation des Proteingemisches aus **Kapitel 4.13.2** überein. Auffällig hierbei ist jedoch der deutliche Unterschied im Bereich der Aminosäuren 25 - 29 welcher als zweite Bindungsstelle definiert wurde. Bei der induzierten Polymerisation erfährt dieser Bereich eine weit deutlichere Volumenabnahme als bei der Eigenpolymerisation, was wohlmöglich durch das zweiwertige Kation hervorgerufen wird.

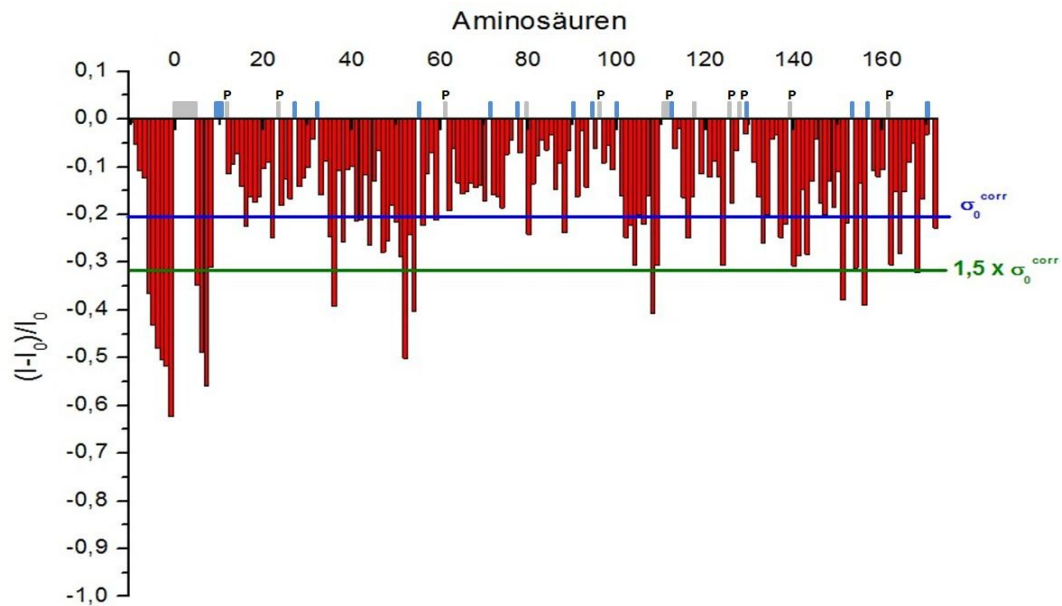


Abbildung 4.55: Intensitäts- / Volumenabnahme der ^{15}N -Signale der Aminosäuren von CanA durch die Eigenpolymerisation nach ca. 100 h; $T = 313\text{ K}$; c (CanA bzw. $\text{K}_1\text{-CanA}$) = 0.3 mM in 20 mM Phosphatpuffer pH = 6.6, 0.4 mM DSS, 10 % D_2O , Spektrometer = 600 MHz; Der dargestellte vordere Bereich der Aminosäuren von -10 bis 0 entspricht mit höchster Wahrscheinlichkeit dem nicht zugeordneten N-Terminus von CanA und ist diesbezüglich von der Reihenfolge der Aminosäure nicht zwangsläufig korrekt; die korrigierte Standardabweichung zu Null σ_0^{corr} (**blaue Linie**; -0.213) wurde nach der Methode von Schumann [13] berechnet. Die **grüne Linie** ist der 1.5 fache Wert von σ_0^{corr} (-0.320) und gibt die Signifikanzgrenze wieder. In **grau** wurden diejenigen Aminosäuren unterlegt, die nicht zuordenbar waren (A1, T2, G3, T4, T79, Y111, T118, sowie alle Proline - mit **P** gekennzeichnet). In **blau** wurden diejenigen Aminosäuren unterlegt, deren Volumenänderungen durch Überlagerungen nicht eindeutig bestimmbar waren.

Die in **Abbildung 4.56** gezeigte Darstellung der Proteinoberfläche von $\text{K}_1\text{-CanA}$ mit den blau markierten Aminosäuren **5A, Q6, A7, A8, A36, T52, A54, A108, V109, A151, G154, L156, V168** von CanA aus der Kontaktpunkteermittlung, fundiert auf ersten Strukturrechnungen mit CNS. Diese berücksichtigt jedoch nicht die NOE-Informationen der unstrukturierten Bereiche, da diese Informationen zum Zeitpunkt der Berechnung noch nicht vorlagen. Diesbezüglich besteht die Möglichkeit von Oberflächenstrukturänderungen. Aus den gezeigten Oberflächendarstellungen geht hervor, dass vermutlich an 5 Seiten des Proteins Kontaktbereiche zu weiteren Proteineinheiten bestehen.

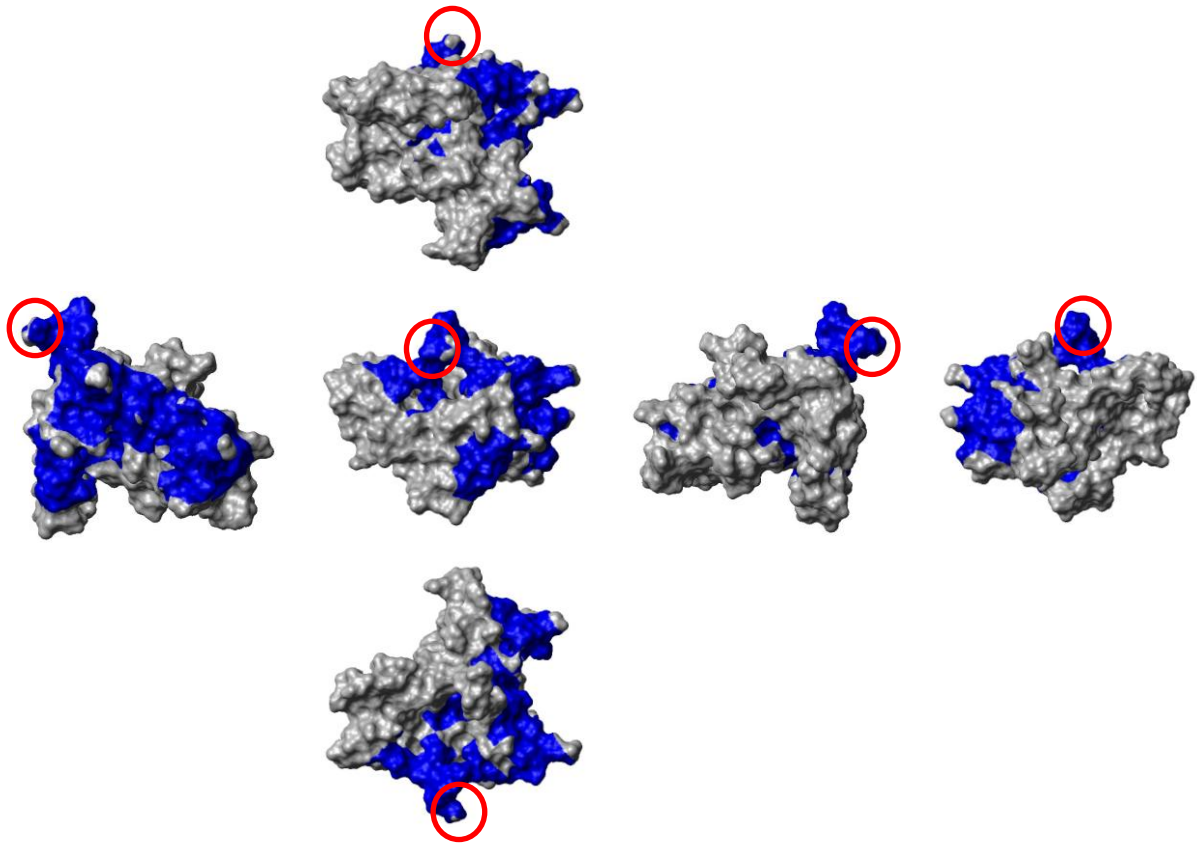


Abbildung 4.56: Oberflächendarstellung des Proteins K₁-CanA mit den möglichen Kontaktstellen (**blau**) der Aminosäuren 5A, Q6, A7, A8, A36, T52, A54, A108, V109, A151, G154, L156, V168; die Oberflächendarstellungen wurden jeweils um 90° Grad gedreht; der N-Terminus beginnend mit A1 wurde jeweils mit einem **roten** Kreis markiert

Es tritt ebenso eine leichte chemische Verschiebung der ¹⁵N-Signale bei der Eigenpolymerisation von CanA auf, jedoch in deutlich geringerem Maße als bei der induzierten Polymerisation (**Abbildung 4.57**). Die Bindungsstellen sind mit Ausnahme des N-Terminus hierbei äquivalent zu denen der Salztitrationsen. Hierbei erscheinen die zwei Bindungszentren jedoch gleichwertig zu sein, womit die damit verbundene chemische Umgebung der Bindungszentren etwas anders gewichtet ist als bei der induzierten Polymerisation.

Deutlich anders verhält sich der flexible N-terminale Bereich, welcher bei der Eigenpolymerisation im Gegensatz zur induzierten Polymerisation ein eigenes, drittes Bindungszentrum einnimmt (Aminosäuren -10 bis -1). Für die Berechnung der kombinierten chemischen Verschiebungen $\Delta\delta_{\text{combined}}$ des nicht zugeordneten

N-Terminus wurde ein gemittelter Wichtungsfaktor der ^1H bzw. ^{15}N chemischen Verschiebungen der Aminosäuren von $w_H = 0.244$ und $w_N = 1.548$ verwendet.

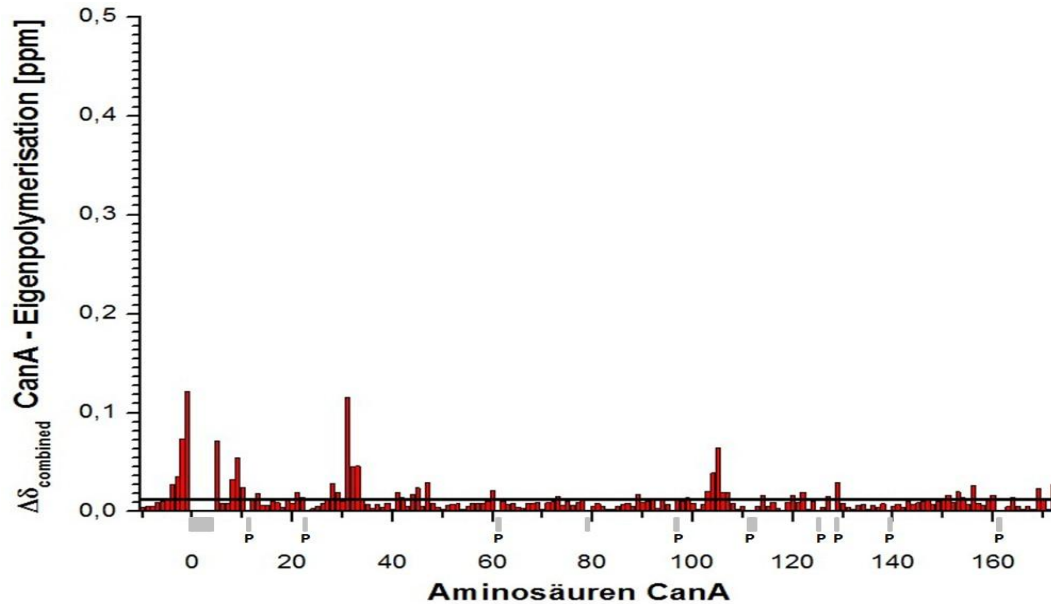


Abbildung 4.57: Balkendiagramm der kombinierten chemischen Verschiebungen aufgetragen gegen die Positionen der Aminosäuren von CanA bei der Eigenpolymerisation von CanA. Die kombinierten chemischen Verschiebungen ($\Delta\delta_{\text{combined shift}}$) wurden anhand der **Formel 3.12** mit ^{15}N -gelabeltem CanA ($c(\text{CanA}) = \text{ca. } 0.3 \text{ mM}$) bei 313 K berechnet. Der dargestellte vordere Bereich der Aminosäuren von -10 bis 0 entspricht mit höchster Wahrscheinlichkeit dem nicht zugeordneten N-Terminus von CanA und ist diesbezüglich von der Reihenfolge der Aminosäure nicht zwangsläufig korrekt. Die korrigierte Standardabweichung zu Null σ_0^{corr} (**schwarze Linie**; 0.012) wurde nach der Methode von Schumann [13] berechnet. In **grau** wurden diejenigen Aminosäuren unterlegt, die nicht zuordenbar waren (A1, T2, G3, T4, T79, Y111, T118, sowie alle Proline - mit **P** gekennzeichnet).

4.13 Strukturbestimmung von K₁-CanA

4.13.1 Vergleich der ¹H-¹⁵N-HSQC von CanA und K₁-CanA

Um einen schnellen strukturellen Vergleich von CanA und K₁-CanA mittels NMR zu erhalten, wurden verschiedene ¹H-¹⁵N-HSQC bei möglichst gleicher Proteinkonzentration und gleichen Umgebungsbedingungen aufgenommen.

Zu einem späteren Zeitpunkt der Promotion wurde festgestellt, dass eine weitere Erhöhung der Temperatur auf 323 K (nahe der maximal zulässigen Temperatur für die verwendeten Cryoprobeköpfe) sowie die Verwendung von (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQCs anstatt von ¹H-¹⁵N-HSQC zu besseren 2D-Spektren mit mehr Signalen und stärkeren Intensitäten führt. Die SOFAST-Methode ermöglicht die H₂O Magnetisierung im thermalen Gleichgewicht zu halten. Dies hilft bei der Detektion von Amidprotonen, die in der Regel einem schnellen Austausch mit H₂O Molekülen unterliegen. Durch die Verwendung einer Sättigung der H₂O Resonanz führt dies zu einem deutlichen Verlust des Signal-zu-Rausch-Verhältnisses [89].

Somit ist ein Vergleich der (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQCs bei 323 K von K₁-CanA und CanA deutlich aussagekräftiger und liefert deutlich definiertere Signale als die ¹H-¹⁵N-HSQC Spektren bei 313 K. Die **Abbildung 4.58** zeigt einen Vergleich der (¹H-¹⁵N)-*sofast*-HMQCs bei 323 K von K₁-CanA und CanA, gemessen an einem 800er Spektrometer. Durch die Messung an einem 800er Spektrometer anstatt einem 600er Spektrometer wird eine deutlich höhere Auflösung erzielt. Zur besseren Veranschaulichung wurde das Spektrum von CanA (**rot**) um -0.03 ppm auf der ¹H-Achse (F2) und um +0.2 ppm auf der ¹⁵N-Achse (F3) leicht verschoben.

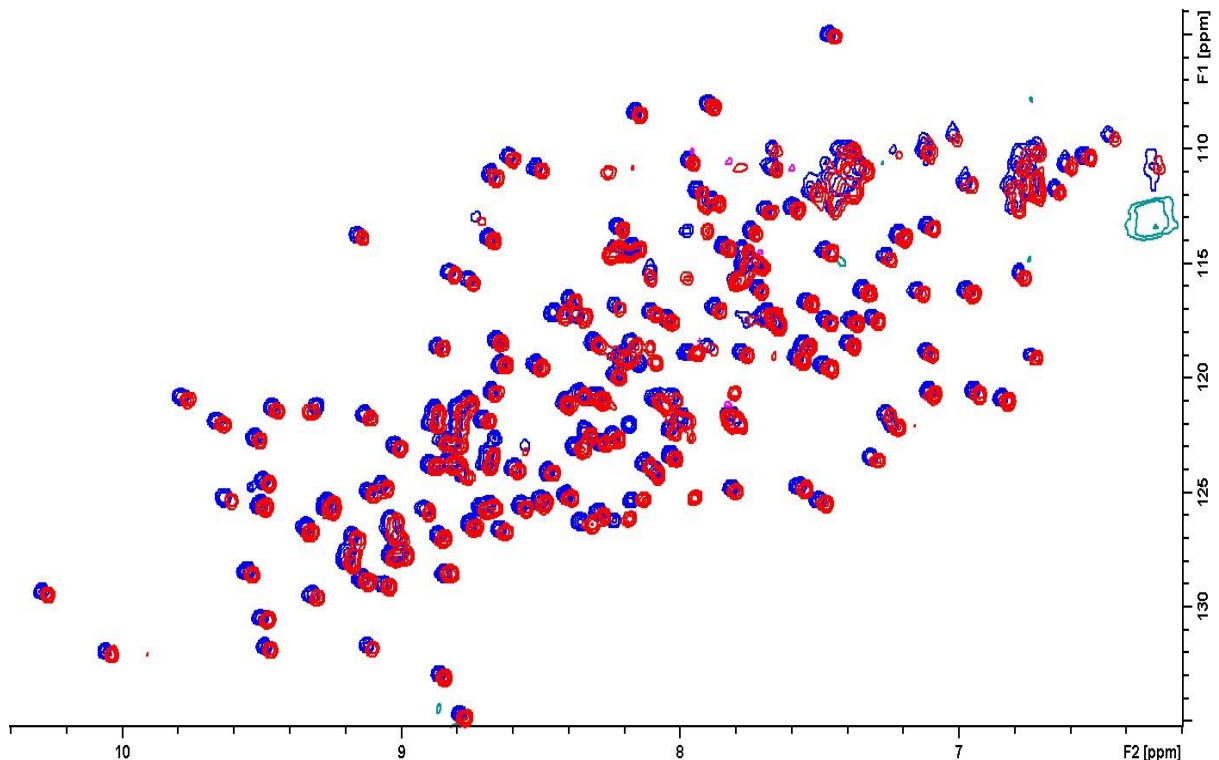


Abbildung 4.58: Vergleich der (^1H - ^{15}N)-sofast-HMQC Spektren von K_1 -CanA (blau) und CanA (rot) bei 323 K; 50 mM TRIS/HCl, pH = 6.6, 80 mM NaCl, 10 % D_2O , 0.4 mM DSS, Spektrometer = 800 MHz, das rote Spektrum wurde um -0.03 ppm in F2 und um +0.2 ppm in F3 verschoben

Die chemischen Verschiebungen beider Proteine stimmen so gut wie überein. Deutlich zu sehen sind jedoch die bei CanA zusätzlich auftretenden Signale. Es sei hier nochmals erwähnt, dass eine vollständige Zuordnung des N-terminalen Bereichs, bei der Strukturbestimmung des um 10 Aminosäuren kleineren Proteins K_1 -CanA nicht möglich war und eine eindeutige Zuordnung erst ab der Aminosäure **A5** von K_1 -CanA dokumentiert werden konnte. Somit kann keine fundierte Aussage über die zusätzlichen Signale von CanA getroffen werden. Es ist jedoch davon auszugehen, dass diese mit hoher Wahrscheinlichkeit dem im Vergleich zu K_1 -CanA um 10 Aminosäuren größeren N-Terminus von CanA und den 5 fehlenden Signalen des N-Terminus von K_1 -CanA zuzuschreiben sind.

4.13.2 Mischexperimente von CanA mit K₁-CanA

Zur Identifikation möglicher Kontaktpunkte zwischen den Proteinuntereinheiten des Polymers von CanA wurde ein Mischexperiment durchgeführt. Hierbei wurde die Reaktion eines Proteingemisches bestehend aus ca. 20% ¹⁵N-K₁-CanA und 80% ungelabeltem CanA bei normalen Polymerisationsbedingungen mittels ¹H-¹⁵N-HSQC-Spektren dokumentiert. Würde das nicht zur Polymerisation fähige Konstrukt K₁-CanA bei der Polymerisation von CanA mit eingebaut werden, hätte dies nur eine einheitliche Volumenabnahme der ¹⁵N-Signale von ¹⁵N-K₁-CanA zur Folge. Bestände jedoch eine unterschiedliche Volumenabnahme der Signale bzw. würden chemische Verschiebungen auftreten, könnte man hierdurch die Kontaktpunkte zwischen den Proteineinheiten identifizieren.

Durch die Zugabe von CanA zu ¹⁵N-K₁-CanA in Abwesenheit von zweiwertigen Kationen konnte weder eine Änderung der chemischen Verschiebungen, noch eine Änderung der Signalintensitäten bei dem aufgenommenen ¹H-¹⁵N-HSQC Spektrum festgestellt werden. Zum besseren Vergleich der Spektren wurde der Verdünnungsfaktor - hervorgerufen durch die Volumenzugabe - über einen Skalierungsfaktor leicht angepasst, sowie das Spektrum des Mischproteinzustandes (**rot**) leicht um -0.025 ppm auf der ¹H-Achse (F2) und um +0.1 ppm auf der ¹⁵N-Achse (F3) verschoben (siehe **Abbildung 4.59**).

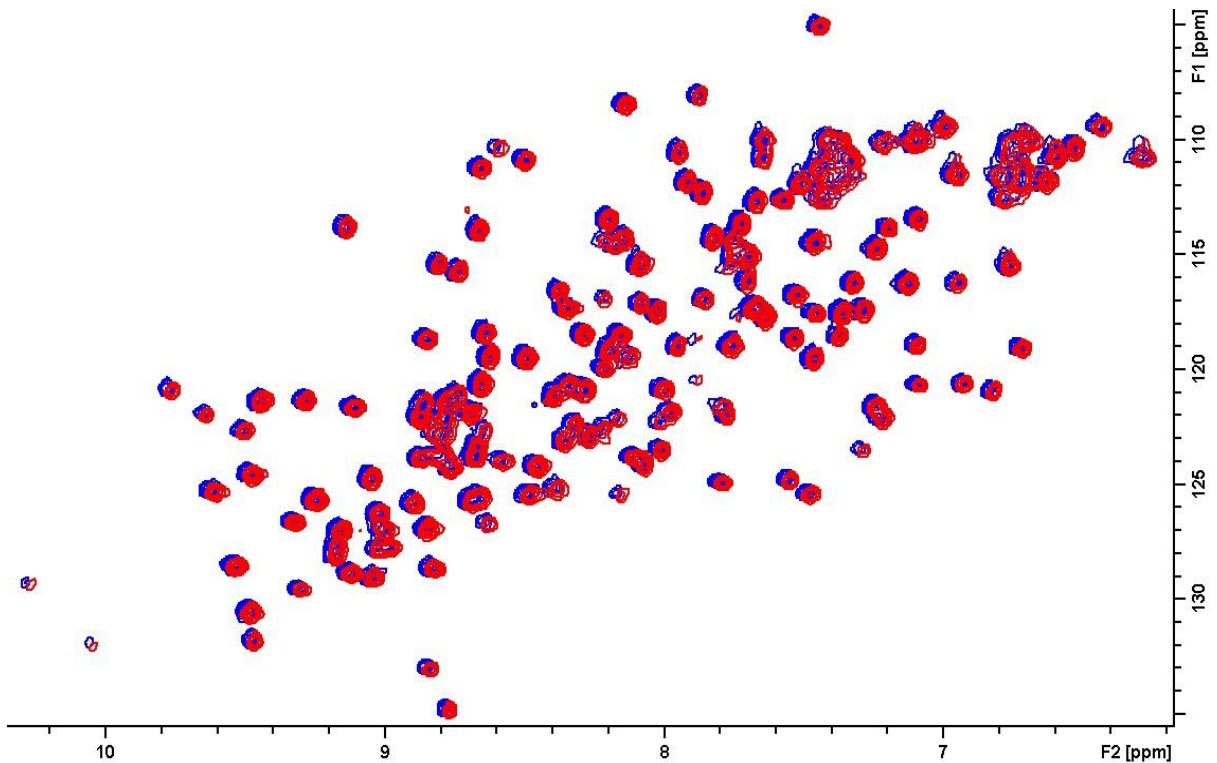


Abbildung 4.59: Vergleich der ^1H - ^{15}N -HSQC-Spektren von ^{15}N -K₁-CanA vor (**blau**) und nach (**rot**) der Zugabe von ungelabeltem CanA bei 323K; Proteinverhältnis 1:4; 50 mM TRIS, 80 mM NaCl, 10 % D₂O, 0.4 mM DSS, 0.4 mM NaN₃, pH = 6.6 das **rote** Spektrum wurde um -0.025 ppm in F2 und um +0.1 ppm in F3 verschoben

Anschließend wurde dem Proteingemisch eine CaCl₂ Lösung zugegeben um die Polymerisation von CanA zu induzieren. Die Erhöhung der CaCl₂ Konzentration in der gemischten Proteinprobe von 0 (**blau**) auf 3.2 mM (**lila**) und 12.8 mM (**rot**) wurde in der **Abbildung 4.60** dargestellt.

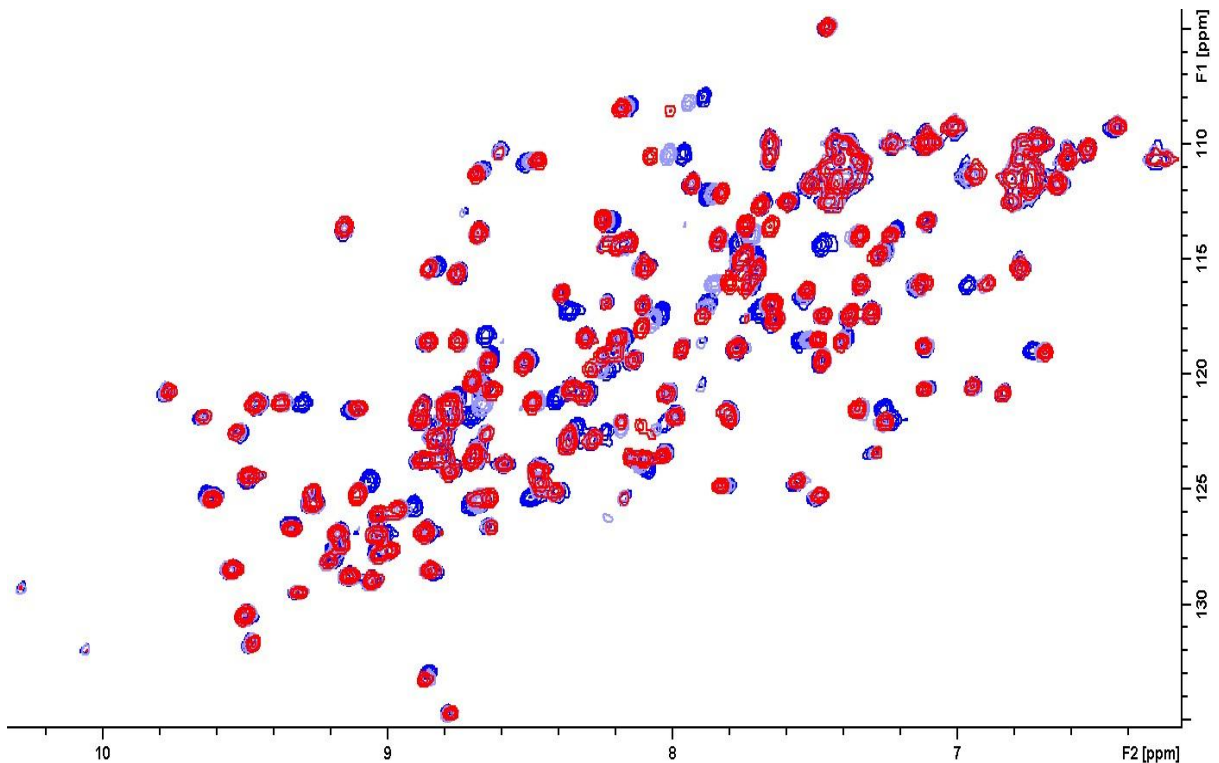


Abbildung 4.60: Vergleich der ^1H - ^{15}N -HSQC Spektren des Proteingemisches bestehend aus 20% ^{15}N -K₁-CanA und 80% CanA bei der Zutitrierung von CaCl_2 in den Schritten 0 (**blau**), 3.2 mM (**lila**) und 12.8 mM (**rot**); T = 323 K, 50 mM TRIS, 80 mM NaCl, 10 % D₂O, 0.4 mM DSS, 0.4 mM NaN₃, pH = 6.6

Wie deutlich zu sehen ist, treten hierbei diverse chemische Verschiebungen der ^{15}N -Signale von K₁-CanA auf. Desweiteren wird eine geringe, einheitliche Abnahme der Signalintensität festgestellt.

Vergleicht man trotz der verschiedenen Pulsprogramme (^1H - ^{15}N -HSQC und (^1H - ^{15}N)-*sofast*-HMQC) die Spektren des Gemisches aus K₁-CanA und CanA bei $c(\text{CaCl}_2) = 12.8 \text{ mM}$ mit den Spektren von K₁-CanA bei $c(\text{CaCl}_2) = 12.8 \text{ mM}$ aus **Kapitel 4.11** so erhält man die **Abbildung 4.61**. Zur besseren Veranschaulichung wurde das Spektrum des Proteingemisches (**rot**) um -0.025 ppm auf der ^1H -Achse (F2) und um +0.1 ppm auf der ^{15}N -Achse (F3) leicht verschoben dargestellt.

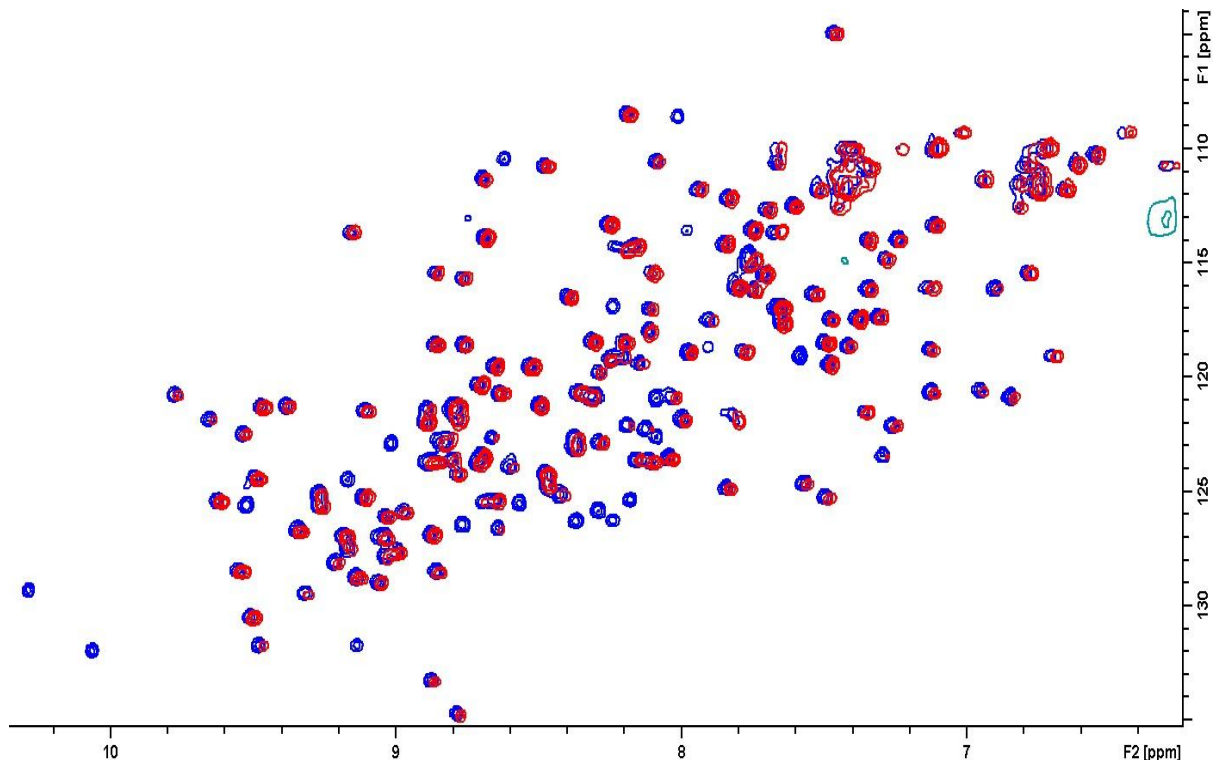


Abbildung 4.61: Vergleich des $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -*sofast*-HMQC von K_1 -CanA der Ca^{2+} -Titration bei 12.8 mM CaCl_2 (**blau**) mit dem $^1\text{H}-^{15}\text{N}$ -HSQC Spektrum des Proteingemisches bei 12.8 mM CaCl_2 (**rot**); $T = 323 \text{ K}$; 50 mM TRIS, 80 mM NaCl, 10 % D_2O , 0.4 mM DSS, 0.4 mM NaN_3 , $\text{pH} = 6.6$; das **rote** Spektrum wurde um -0.025 ppm in F2 und um +0.1 ppm in F3 verschoben

Die chemischen Verschiebungen der beiden Spektren sind so gut wie identisch. Einige Signale haben jedoch eine deutlich geringere Intensität. Das generelle Fehlen einiger ^{15}N -Signale im Spektrum des Proteingemisches (**rot**) gegenüber dem Calcium-Titrationsspektrum von K_1 -CanA (**blau**), ist auf die Verwendung der unterschiedlichen Pulsprogramme zurückzuführen.

Die **Abbildung 4.62** gibt die durch die Polymerisation auftretende Abnahme der einzelnen ^{15}N -Signal-Intensitäten der Aminosäuren des Proteingemisches wieder. Hierbei wurde die Volumenabnahme jedes Signals durch das dazugehörige Anfangsvolumen geteilt. Für die weitere Auswertung wurden nur signifikante Volumenänderungen mit einer Volumenabnahme von mehr als dem 1.5 fachen Wert von σ_0^{corr} ($= 35\%$) berücksichtigt.

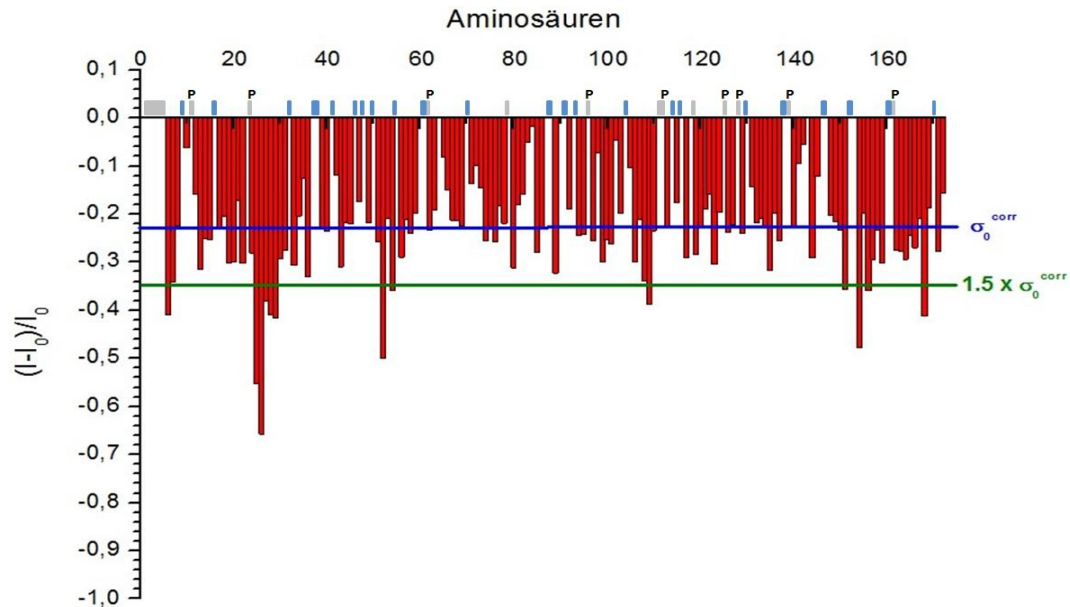


Abbildung 4.62: Intensitäts- / Volumenabnahme der ^{15}N -Signale der Aminosäuren des Proteingemisches (20% ^{15}N -K₁-CanA und 80% CanA), hervorgerufen durch die Polymerisation mit 12.8 mM CaCl_2 ; $T = 323\text{ K}$, 50 mM TRIS, 80 mM NaCl, 10 % D_2O , 0.4 mM DSS, 0.4 mM NaN_3 , pH = 6.6; die korrigierte Standardabweichung zu Null σ_0^{corr} (**blaue Linie**; -0,232) wurde nach der Methode von Schumann [13] berechnet. Die **grüne Linie** ist der 1.5 fache Wert von σ_0^{corr} (-0.348) und gibt die Signifikantsgrenze wieder. In **grau** wurden diejenigen Aminosäuren unterlegt, die nicht zuordenbar waren (A1, T2, G3, T4, T79, Y111, T118, sowie alle Proline - mit **P** gekennzeichnet). In **blau** wurden diejenigen Aminosäuren unterlegt, deren Volumenänderungen durch Überlagerungen nicht eindeutig bestimmbar waren.

Die Aminosäuren **Q6, A7, A25, G26, A27, Q28, G29, T52, A54, A108, V109, A151, G154, L156, V168** erreichten eine signifikante Volumenänderung von mehr als 37% und sind somit mögliche Kontaktpunkte zwischen den Proteinuntereinheiten des Polymers von CanA. Die in **Abbildung 4.63** gezeigte Darstellung der Proteinoberfläche von K₁-CanA mit den blau markierten Aminosäuren **Q6, A7, A25, G26, A27, Q28, G29, T52, A54, A108, V109, A151, G154, L156, V168** von CanA aus der Kontaktpunkteermittlung, fundiert auf ersten Strukturrechnungen mit CNS. Diese berücksichtigt jedoch nicht die NOE-Informationen der unstrukturierten Bereiche, da diese Informationen zum Zeitpunkt der Berechnung noch nicht vorlagen. Diesbezüglich besteht die Möglichkeit von Oberflächenstrukturänderungen. Aus den gezeigten Oberflächendarstellungen geht hervor, dass vermutlich an 5 Seiten des Proteins Kontaktbereiche zu weiteren Proteineinheiten bestehen.

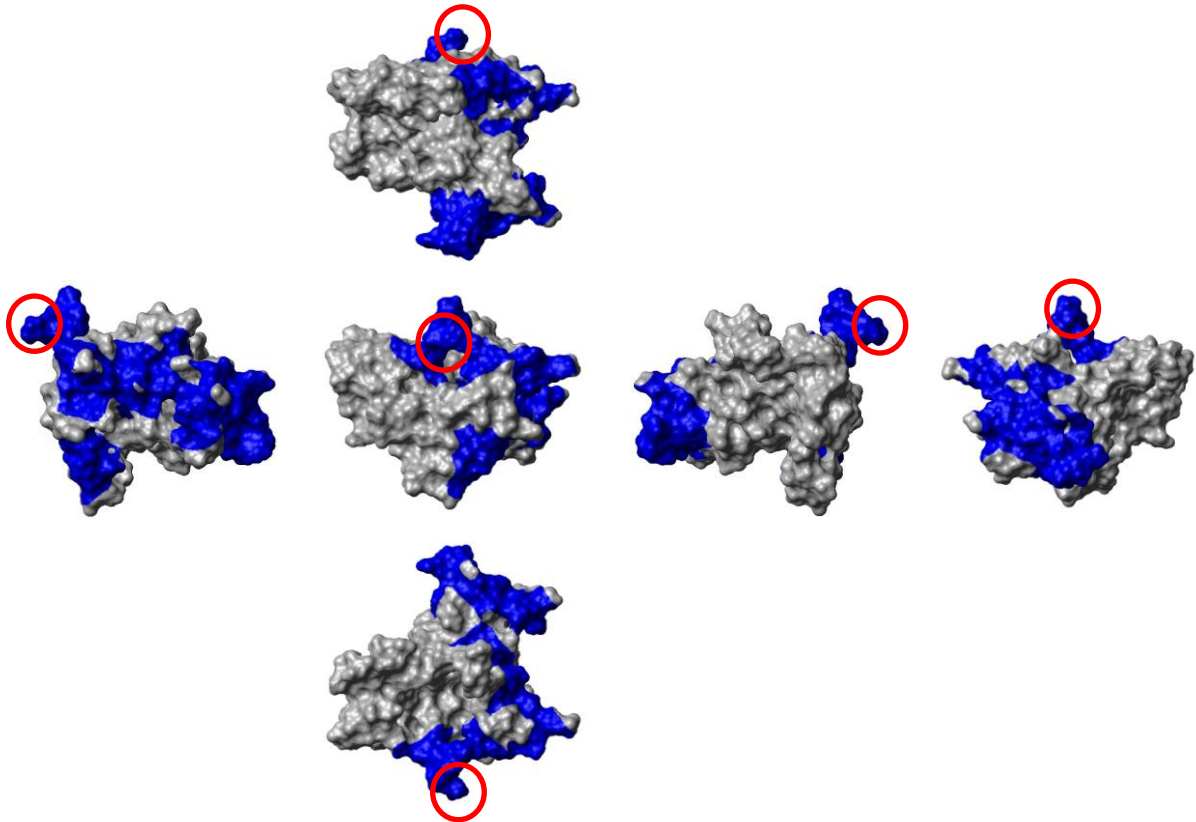
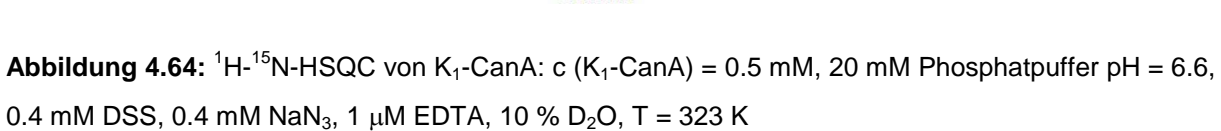


Abbildung 4.63: Oberflächendarstellung des Proteins K₁-CanA mit den möglichen Kontaktstellen (blau) der Aminosäuren Q6, A7, A25, G26, A27, Q28, G29, T52, A54, A108, V109, A151, G154, L156, V168; die Oberflächendarstellungen wurden jeweils um 90° Grad gedreht; der N-Terminus beginnend mit A1 wurde jeweils mit einem roten Kreis markiert

4.13.3 Die sequentielle Zuordnung von K₁-CanA

Die **Abbildung 4.64** zeigt ein ¹H-¹⁵N-HSQC welches einen schnellen Überblick über die chemischen Verschiebungen der Resonanzfrequenzen der Zuordnung des Rückgrat H^N-Protonen und N-Atomen der Aminosäuren von CanA liefert. Ausgenommen sind hierbei Proline welche aufgrund des Magnetisierungstransfers über H^N bei einem HSQC Experiment nicht angeregt werden. Es sei hierbei erwähnt, dass die Beschriftung der Signale in **Abbildung 4.64** nicht der üblichen Nomenklatur von IUPAC entspricht, sondern für die Zuordnung und Auswertung der Daten dementsprechend gewählt wurde.



126

Proline existiert. Eine weitere Überprüfung der Aminosäurezuordnung erfolgte im späteren Verlauf durch die Seitenkettenuordnung über das HCCH-TOCSY Experiment, bei dem für Aminosäuren spezifische, charakteristische Spinmuster auftreten. Hierdurch konnten Inkonsistenzen in den Datensätzen bereinigt und die chemischen Verschiebungen der Aminosäuren des Proteinrückrats zu 97% zugeordnet werden (**Tabelle 4.1**).

A	T	G	T	A	Q	A	V	S	E	P	I	D	V	E	S	H	L	G	S	I	T	P	A	A	G	A	Q	G	S																														
1																														30																													
D	D	I	G	Y	A	I	V	W	I	K	D	Q	V	N	D	V	K	L	K	V	T	L	A	N	A	E	Q	L	K																														
																														60																													
P	Y	F	K	Y	L	Q	I	Q	I	T	S	G	Y	E	T	N	S	T	A	L	G	N	F	S	E	T	K	A	V																														
																														90																													
I	S	L	D	N	P	S	A	V	I	V	L	D	K	E	D	I	A	V	L	Y	P	D	K	T	G	Y	T	N	T																														
																														120																													
S	I	W	V	P	G	E	P	D	K	I	I	V	Y	N	E	T	K	P	V	A	I	L	N	F	K	A	F	Y	E																														
																														150																													
A	K	E	G	M	L	F	D	S	L	P	V	I	F	N	F	Q	V	L	Q	V	G																																						
																						172																																					

Tabelle 4.1: Sequentielle Zuordnung des Proteinrückgrats von K₁-CanA: In Grün dargestellt wurden die Aminosäuren, deren chemischen Verschiebungen für N, H^N, C^α und C^β des Rückgrats bekannt sind. In Rot wurden die Aminosäuren dargestellt, die nicht zuordenbar waren. Einzelne Ausnahmen bilden hierbei die Aminosäuren A1 bis T4, T79, Y111 und T118 bei denen kein H^N zugeordnet werden konnte.

Insgesamt konnten bei der sequentiellen Zuordnung des Proteinrückgrats 96% aller chemischen Verschiebungen der H^N Protonen (Proline sind hierbei durch das Fehlen des H^N-Protons ausgenommen), 98% aller N-Kerne, 99% aller C^α-Kerne, 99% aller C^β-Kerne und 91% aller C^γ-Kerne ermittelt werden. Der niedrige Prozentsatz an CO Signalen resultiert zum einen aufgrund des Magnetisierungstransfers des HNCO Experiments (eine Magnetisierung über die H^N Protonen der Aminosäure i sowie der Transfer zu C=O von i-1, ist vor Prolinen, sowie bei der C-terminalen Aminosäure nicht möglich, für CanA bedeutet dies 10 chemische Verschiebungen weniger) sowie

aufgrund der schwachen Intensität der C=O Signale des flexiblen, unstrukturierten N-Terminus. Die Nichtzuordnung weiterer H^N Protonen Signale ist vermutlich auf den mittleren Austausch der H^N Protonen mit Wasser zurückzuführen welcher bei hohen Temperaturen (Messtemperatur war 323 K) stark zunimmt.

Die Zuordnung der chemischen Verschiebungen der Seitenketten konnte nahezu vollständig durchgeführt werden. Schwierigkeiten bereiteten Aminosäuren mit längeren Seitenketten wie z.B. Lysine, Isoleucine und Leucine was auf den weiten Magnetisierungstransfer und der damit verbundenen Abschwächung der Signalintensität zurückzuführen ist. Ebenso hervorzuheben sind hierbei die Amid-Protonen der 8 Glutamine welche durch die geringen Unterschiede in den chemischen Verschiebungen oft nicht eindeutig zuzuordnen waren. Die Amid-Protonen der Seitenketten der 12 Lysine konnten aufgrund der hohen Messtemperatur, welche den Austausch der Amid-Protonen mit H_2O begünstigt und deswegen zur Verbreiterung der Signale führt, nicht eindeutig zugeordnet werden. Bei Aminosäuren, die in den Seitenketten Aromaten aufwiesen, konnten nahezu alle Protonen der Aromaten zugeordnet werden.

4.13.4 Sekundärstrukturbestimmung von K_1 -CanA

Im Vorfeld wurde bereits durch die Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie und die Circular dichroismus-Spektroskopie festgestellt, dass die Sekundärstruktur von K_1 -CanA einen sehr hohen Anteil an β -Faltblättern aufweist.

Die Sekundärstrukturvorhersage der CD-Spektroskopie für das Protein K_1 -CanA ergab einen 5%igen α -Helix-, einen 41%igen β -Faltblatt-, einen 22%igen Schleifen- und einen 31%igen ungeordneten Anteil.

Ebenso sind die meisten durch NMR zugeordneten chemischen Verschiebungen der C-Atome des Proteinrückrats eindeutig charakteristisch für eine ausgeprägte β -Faltblatt-Sekundärstruktur. Die durch die sequenzielle Zuordnung erhaltenen chemischen Verschiebungen des Proteinrückrats und der Seitenketten wurden anschließend in das Programm TALOS+ importiert um eine weitere Vorstellung über die Sekundärstruktur zu bekommen und die Torsionswinkel des Proteinrückrats zu

berechnen [82]. Die **Abbildung 4.65** und **Abbildung 4.66** geben die anhand der chemischen Verschiebungen des Proteinrückrats durch TALOS+ berechnete Sekundärstruktur wieder [83].

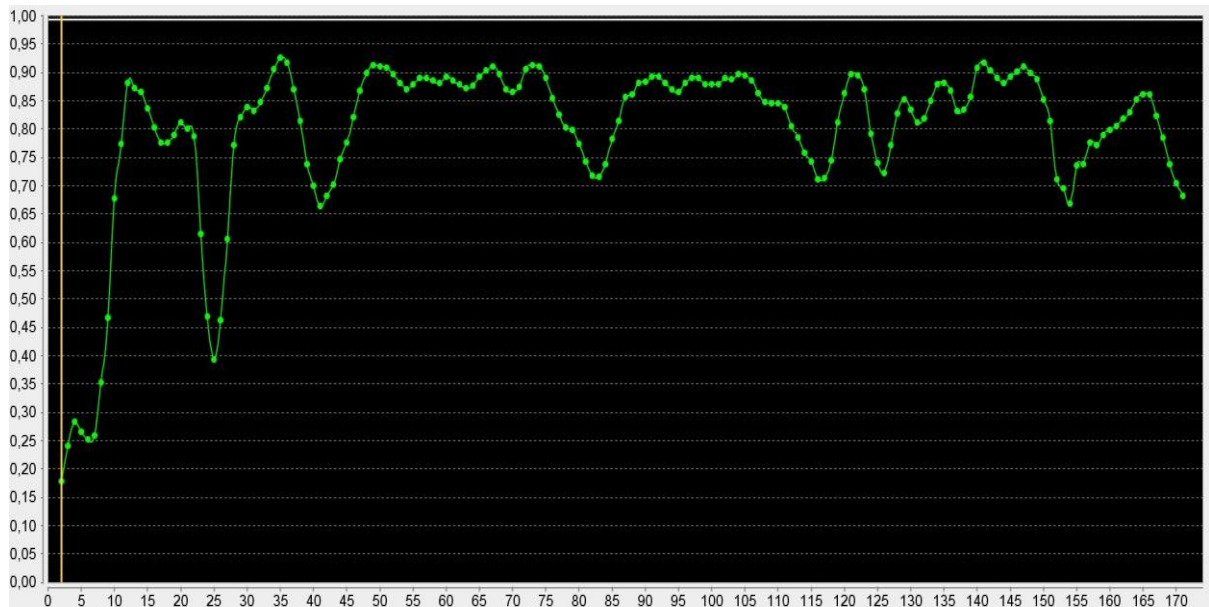


Abbildung 4.65 RCI (random-coil-index)-S² Voraussage der einzelnen Aminosäuren von K₁-CanA durch TALOS+, anhand der chemischen Verschiebungen des Proteinrückrats

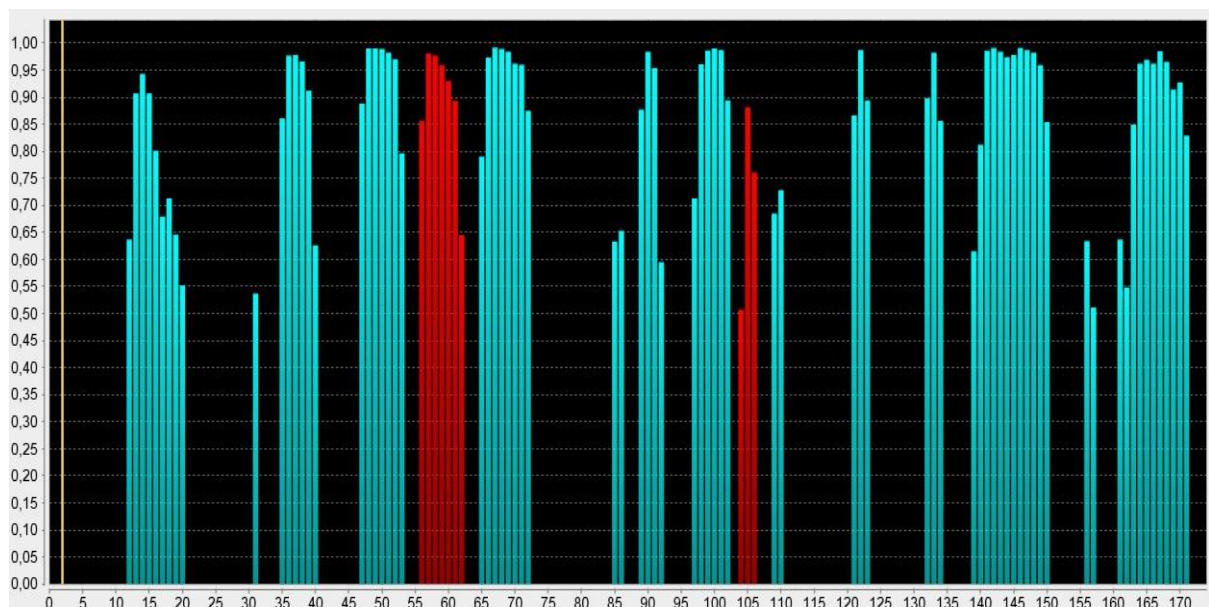


Abbildung 4.66 Voraussage der Sekundärstrukturelemente der einzelnen Aminosäuren von K₁-CanA durch TALOS+, anhand der chemischen Verschiebungen des Proteinrückrats (C', C^α, C^β, N, H^N, H^α und H^β) In Rot α-Helices, in Blau β-Faltblätter; die Höhe des Balken gibt die Wahrscheinlichkeit für die Strukturelementzuordnung der jeweiligen Aminosäure wieder.

Hieraus ergaben sich großflächige Gruppierungen wohldefinierter Strukturelemente durch die die Aminosäuresequenz in folgende Strukturbereiche gegliedert werden konnte:

Bezeichnung	Aminosäure	α -Helix	β -Faltblatt	coil
	1 bis 11			x
$\beta 1$	12 bis 20		x	
	21 bis 34			x
$\beta 2$	35 bis 40		x	
	41 bis 46			x
$\beta 3$	47 bis 53		x	
	54 bis 55			x
$\alpha 1$	56 bis 62	x		
	63 bis 64			x
$\beta 4$	65 bis 72		x	
	73 bis 84			x
$\beta 5$	85 bis 86		x	
	87 bis 88			x
$\beta 6$	89 bis 92		x	
	93 bis 96			x
$\beta 7$	97 bis 102		x	
	103			x
$\alpha 2$	104 bis 106	x		
	107 bis 108			x
$\beta 8$	109 bis 110		x	
	111 bis 120			x
$\beta 9$	121 bis 123		x	
	124 bis 131			x
$\beta 10$	132 bis 134		x	
	135 bis 138			x
$\beta 11$	139 bis 150		x	
	151 bis 155			x
$\beta 12$	156 bis 157		x	
	158 bis 160			x
$\beta 13$	161 bis 171		x	
	172			x

Die durch TALOS+ berechnete Sekundärstrukturzusammensetzung ergab einen Anteil aus 6% α -Helix, 44% β -Faltblatt und 50% ungeordnet (wobei diese die Schleifenanteile mit beinhalten).

Die durch TALOS+ vorgeschlagenen Strukturbereiche wurden anschließend durch die NMR Daten der NOE- und Wasserstoffbrücken-Kontakte (siehe **Kapitel 3.2.2.3.3** und **3.2.2.4.2**) der einzelnen Strukturelemente zueinander verifiziert und validiert. Hieraus ergab sich die in **Abbildung 4.67** und **Abbildung 4.68** dargestellten Kopplungsmuster der einzelnen antiparallel zueinander liegenden β -Faltblätter. Wie deutlich zu sehen ist, werden durch die antiparallel zueinander liegenden β -Faltblätter zwei große Ebenen aufgespannt. Eine Besonderheit liegt hierbei im Kopplungsmuster zwischen den Faltblättern **β_{11}** und **β_2** . Im Bereich der Aminosäuren 34 / 33 vollführt das Faltblatt **β_2** an seinem partiellen C-Terminus eine 180° Drehung.

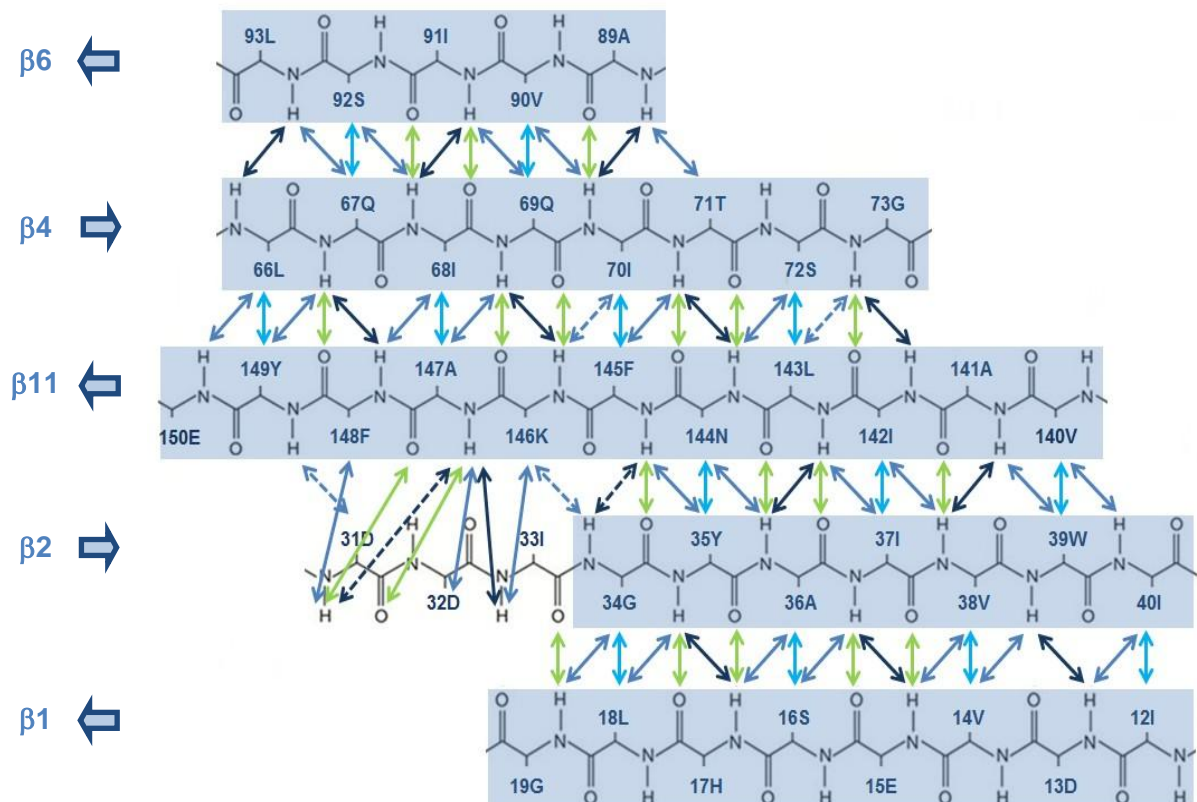


Abbildung 4.67: Darstellung der Verknüpfungen der einzelnen antiparallelen β -Faltblätter; Wasserstoffbrücken zwischen H^N -CO wurden in **grün**, die NOEs zwischen H^N - $H\alpha$, $H\alpha$ - $H\alpha$ und H^N - H^N in **blau** dargestellt. Gestrichelte Linien geben Kopplungen wieder, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

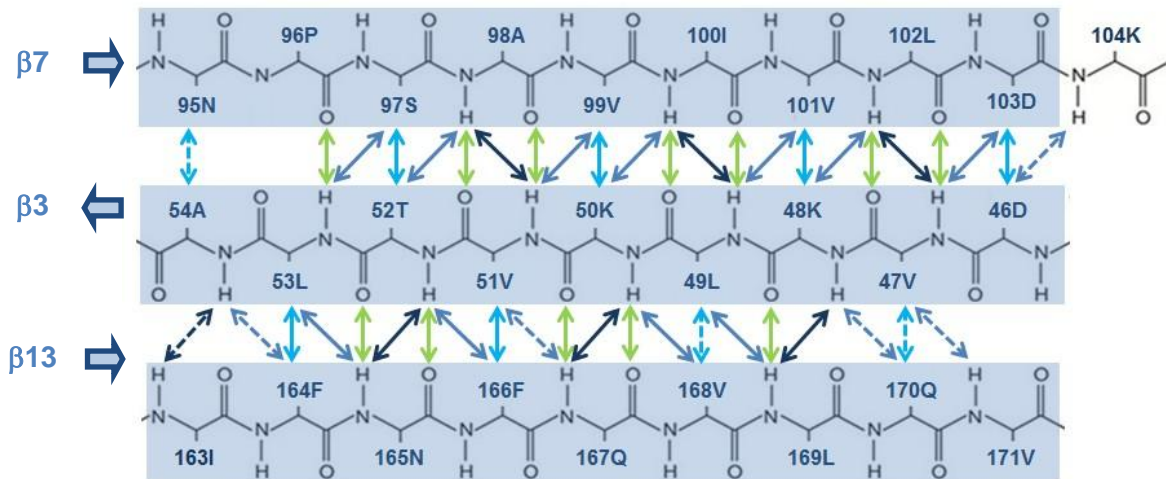


Abbildung 4.68: Darstellung der Verknüpfungen der einzelnen antiparallelen β -Faltblätter; Wasserstoffbrücken zwischen H^N -C' wurden in **grün**, die NOEs zwischen H^N - H^α , H^α - H^α und H^N - H^N in **blau** dargestellt. Gestrichelte Linien geben Kopplungen wieder, die nicht eindeutig zugeordnet werden konnten.

Die starke intermolekulare Verknüpfung der β -Faltblätter sowie die durch TALOS+ berechneten Strukturbereiche ließ bereits vor der eigentlichen Strukturrechnung vermuten, dass die Sekundärstruktur von K₁-CanA wie in **Abbildung 4.69** dargestellt definiert sein musste.

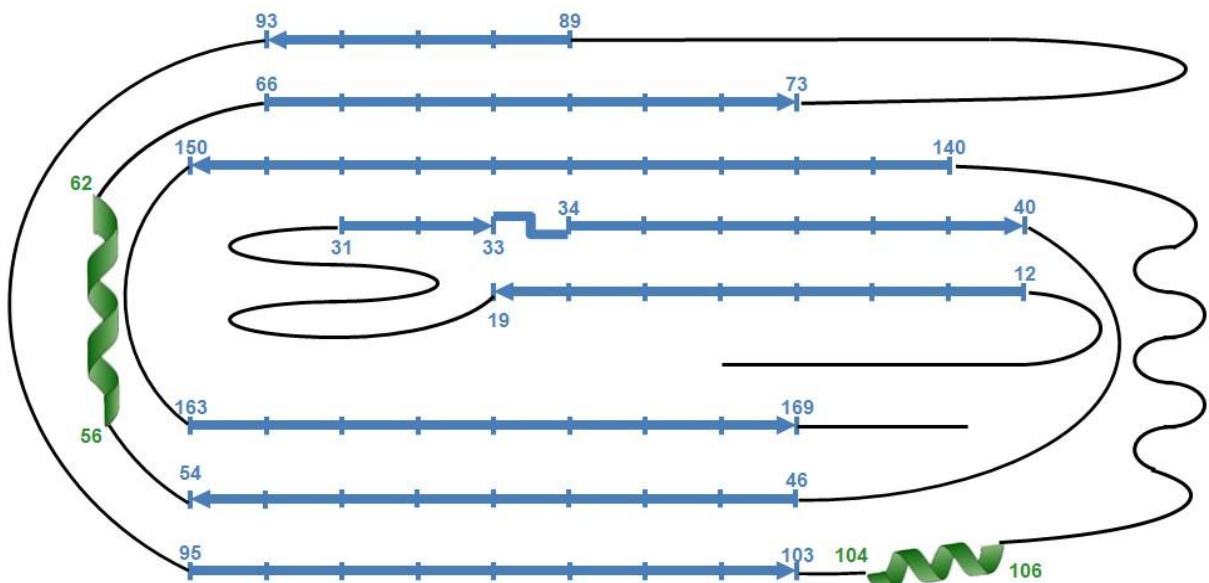


Abbildung 4.69: Schematische Darstellung der ersten Sekundärstrukturvorhersage aufgrund der physikalischen Verknüpfungen der β -Faltblätter sowie der TALOS+ Vorhersage der α -helicalen Bereiche; β -Faltblätter wurden **blau**, α -Helices **grün** und random coil sowie loops **schwarz** dargestellt.

4.13.5 Die cis- / trans- Konformation der Proline von K₁-CanA

Die Sequenz von K₁-CanA (ebenso wie die von CanA) besitzt insgesamt 9 Proline die eine cis- bzw. trans-Konformation (bei Isomeren sowohl cis- als auch trans-) in der Peptidbindung aufweisen können. Die Peptidbindungen wurden wie in **Kapitel 3.2.5** beschrieben nach zwei Verfahren den jeweiligen Konformationszuständen zugeordnet.

Durch das Verfahren der chemischen Verschiebungsdifferenz $\Delta_{\beta\gamma}$ konnten, wie in **Tabelle 3.1** zu sehen ist, die Konformationen der Proline erarbeitet werden. Aufgrund der fehlenden Zuordnung der C ^{β} und C ^{γ} Werte bei den Aminosäuren **P125** und **P139**, konnten diese Proline durch das Verfahren der chemischen Verschiebungsdifferenz nicht erfasst werden.

Aminosäure	C ^{β}	C ^{γ}	$\Delta_{\beta\gamma}$	Konformation
P11	32,11	27,27	4,84	trans
P23	31,65	26,96	4,69	trans
P61	31,33	27,74	3,59	trans
P96	32,74	26,49	6,25	trans
P112	32,27	26,80	5,47	trans
P125	31,33	?		keine Aussage mögl.
P128	31,18	26,80	4,38	trans
P139	31,78	?		keine Aussage mögl.
P161	32,43	26,48	5,94	trans

Tabelle 4.2: Konformationszuweisung der Proline über ihre chemische Verschiebungsdifferenz $\Delta_{\beta\gamma}$, die nicht vorhandenen Informationen der C ^{γ} Werte der Aminosäuren P125 und P139 wurden mit einem ? gekennzeichnet.

Das Verfahren der NOE-Kontakte bereitete einige Schwierigkeiten, da viele der H ^{α} Protonen der Proline (bei **P11**, **P23**, **P139**, **P161**) durch das starke Wassersignal

überlagert wurden. Die NOE-Zuordnung ergab folgende Konformationszuweisung für die $X_{(i-1)}$ -Prolin $_{(i)}$ -Peptidbindungen (**Tabelle 4.3**).

Aminosäure	$H^{\alpha}_{(i)}-H^{\alpha}_{(i-1)}$	$H^{\alpha}_{(i)}-H^N_{(i-1)}$	$H^N_{(i-1)}-H^{\delta}_{(i)}$	$H^{\delta}_{(i)}-H^{\alpha}_{(i-1)}$	Konformation
P11	?	?	X	X	trans
P23	?	?	X	X	trans
P61	-	-	X	X	trans
P96	-	-	X	X	trans
P112	-	-	?	X	trans
P125	(X)	(X)	?	?	wahrscheinl. cis
P128	(X)	(X)	X	X	wahrscheinl. trans
P139	?	?	?	?	keine Aussage mögl.
P161	?	?	X	X	trans

Tabelle 4.3: Konformationszuweisung der Proline über ihre NOE-Kontakte; sichere Kontakte wurden mit einem **X**, unsichere Kontakte mit einem **(X)**, nicht vorhandene Kontakte mit einem **-** und nicht zuordnungsbar Kontakte (aufgrund von fehlenden Protonenwerten bzw. aufgrund von Überlagerungen mit dem Wassersignal) mit einem **?** gekennzeichnet.

Die fehlende Zuordnung der H^{δ} -Protonen bei den Aminosäuren **P125** und **P139** führte zu einer nur unzureichenden Konformationsklassifizierung. Des Weiteren wird das H^{α} Proton der Aminosäure **K138** bei 4.50 ppm ebenfalls durch das Wassersignal überlagert, was eine $H^{\alpha}_{(i)}-H^{\alpha}_{(i-1)}$ NOE-Kontaktzuordnung und somit eine Konformationsklassifizierung über die NOE-Kontakte für **P139** unmöglich macht. Selbst die Auswertung der NOE-Daten eines in D_2O aufgenommenen ^{15}N -NOESY-Spektrums des Proteins K₁-CanA konnte keine weiteren Informationen über die NOE-Kontakte von **P139** liefern. Somit konnte keine Aussage über den Konformationszustand von **P139** getroffen werden. Die Aminosäure **P128** zeigt sowohl sehr schwache $H^{\alpha}_{(i)}-H^{\alpha}_{(i-1)}$ und $H^{\alpha}_{(i)}-H^N_{(i-1)}$ NOE-Kontakte als auch starke $H^N_{(i-1)}-H^{\delta}_{(i)}$ und $H^{\delta}_{(i)}-H^{\alpha}_{(i-1)}$ NOE-Kontakte. Aufgrund der starken Intensitätsunterschiede wurde die Peptidbindung von **X-P128** als trans-Konformation eingestuft.

4.14 NMR Struktur von K₁-CanA

Durch die 2D und 3D NMR-Experimente TOCSY, NOESY, ¹³C-HSQC, ¹⁵N-HSQC, (H_B)C_B(C_GCC_TOCSY)Har, (H_B)C_B(C_GC_D)H_D, ¹⁵N-NOESY, HNCA, HNCO, C_BC_ANH, C_BC_A(CO)NH, HCCH-TOCSY und HCAN konnten verschiedenste Daten, welche für eine Strukturberechnung nötig sind, gesammelt werden. Die über TALOS+ berechneten Torsionswinkel des Proteinrückrats, die Konformationen der Proline, sowie aussagekräftige NOE-Daten zwischen den einzelnen Sekundärstrukturelementen flossen in die Berechnung über das Programm CNS mit ein. Leider war es bis zum Abschluss dieser Arbeit nicht möglich, sämtliche NOE-Kontakte des Programms KNOWNOE zu verwenden, da K₁-CanA mit 172 Aminosäuren zu groß für eine exakte NOE-Zuordnung durch KNOWNOE ist. Da das Programm jedoch bereits für größere Proteine optimiert wird, wird in nicht allzu ferner Zukunft eine vollständige Strukturberechnung unter Berücksichtigung sämtlicher auftretenden NOE-Kontakte möglich sein. Die **Abbildung 4.70** zeigt eine die für K₁-CanA möglichen Strukturen ohne die Berücksichtigung der NOE-Kontakt-Informationen aus den unstrukturierten Bereichen.

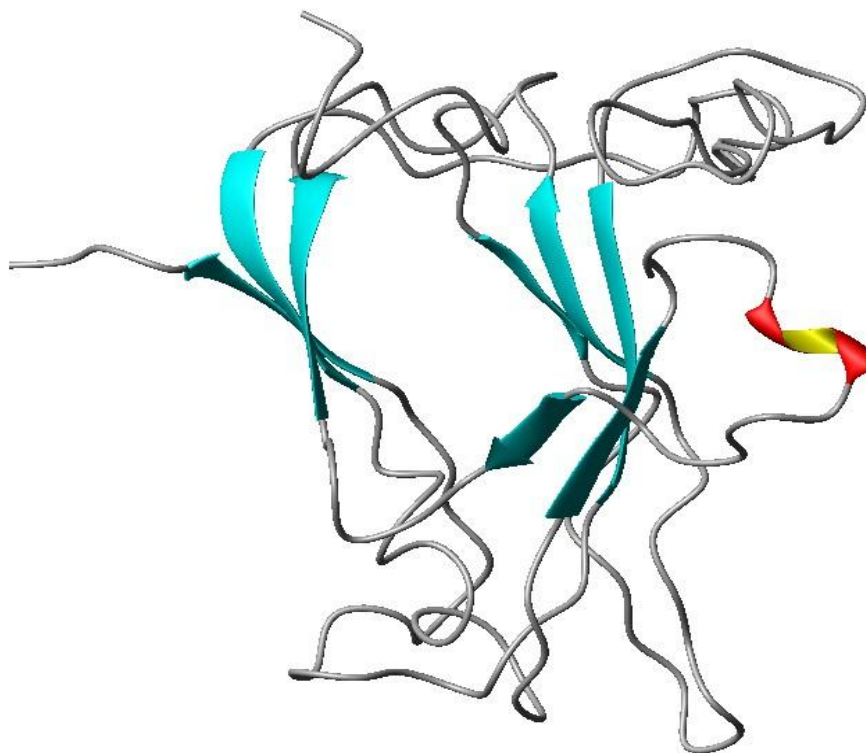


Abbildung 4.70: Erste Strukturrechnungen des Proteins K₁-CanA ohne vollständige NOE-Zuordnung

Die schlechte Faltung der weitläufigen Loopregionen an den Enden des β -Faltblatt-Barrels kommt durch das Fehlen der benötigten NOE-Kontakt-Informationen zustande.

Zur besseren Darstellung des β -Faltblatt-Barrel-Charakters von K₁-CanA wurde eine CNS Rechnung mit stark verkürzten Loopregionen durchgeführt (**Abbildung 4.71**).

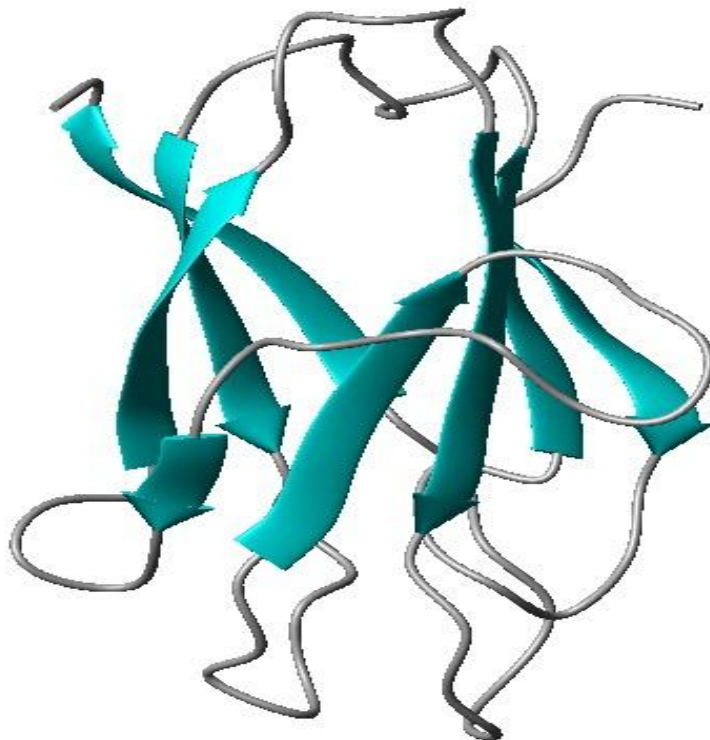


Abbildung 4.71: Erste Strukturrechnungen des Proteins K₁-CanA ohne vollständige NOE-Zuordnung; die weitläufigen Loopregionen wurden bei dieser CNS Rechnung nicht berücksichtigt um das β -Faltblatt-Barrel besser darstellen zu können.

5 Diskussion

5.1 Expression und Reinigungsschritte von CanA und K₁-CanA

In der Arbeit von Katrin Singer wird im **Kapitel Ergebnisse 4.2.1** ein Verbesserungsversuch der Ionenaustauschchromatographie gegenüber dem Aufschluss von Bianca Mai vorgeschlagen. Hierbei wurden die Zellen wie in der Arbeit von Bianca Mai in 10 mM TRIS-Puffer (pH = 7.5) nativ aufgeschlossen und der Überstand auf eine Anionenaustauschersäule (Q-Sepharose) aufgetragen. Der Verbesserungsvorschlag von Katrin Singer umfasste, anstatt einer isokratischen Elution mit TRIS-Puffer wie in der Arbeit von Bianca Mai, einen linearen Salzgradienten von 0 bis 800 mM zu verwenden. Hierbei wurde beobachtet, dass das Protein CanA sowohl im Vorlauf bei 0 mM NaCl, als auch bei einer Konzentration von 140 - 160 mM eluierte. Auch durch eine Variation des pH-Wertes konnte eine bessere Auftrennung der einzelnen Proteinfractionen bei der Ionenaustauschchromatographie nach ihrer Aussage durch den eingeführten Salzgradienten nicht verbessert werden. Somit wurde die eingeführte Salzgradientenelution zur Erhöhung des Reinheitsgrades von Katrin Singer selbst verworfen und CanA weiterhin mit einer isokratischen Elution über eine Q-Sepharose-Säule gereinigt.

Eigens durchgeführte Experimente bestätigten jedoch eindeutig, dass die Elution über einen linearen Salzgradienten sehr wohl eine deutliche Steigerung der Trennung der Proteinfractionen bei der Ionenaustauschchromatographie mit sich bringt. Die über IR-Spektroskopie aufgezeichneten Elutionsprofile (in den Arbeiten von Katrin Singer und Bianca Mai wurden ausschließlich Stichproben der aufgefangenen Elutionsfraktionen über SDS-PAGE analysiert) von CanA und K₁-CanA ergaben eindeutige Proteinspitzenmengen bei 150 mM NaCl, die bei isokratischer Elution ohne Salzzugabe bis zur Reinigung der Säule (mit 2 M NaCl-Lösung) auf der Säule haften bleiben. Desweiteren können durch die lineare Gradientenelution eindeutig Proteinverunreinigungen abgetrennt und die Proteinfractionen von CanA bzw. K₁-CanA in einem sehr hohen Reinheitsgrad isoliert

werden. Die von Katrin Singer beobachteten CanA Proteinmengen bei 0 mM NaCl welche sie „im Vorlauf“ benannte, beruhen wohlmöglich auf einer Überladung der Säulenkapazität. Durch die Einführung des idealen Salzgradienten von 0 bis 500 mM NaCl bei einem Gesamtelutionsvolumen von 1.4 L und einer Erhöhung der Säulenkapazität (anstatt einer High Load 26/10 Q Sepharose Fast Flow Säule wurde High Load 26/60 Q Sepharose Fast Flow Säule verwendet) konnte ein signifikant erhöhter Reinheitsgrad von CanA und K₁-CanA bei maximaler Proteinausbeute erzielt werden. Die Einführung des hohen Salzgradienten machte jedoch eine anschließende Gelfiltration trotz des hohen Reinheitsgrades unumgänglich, da wie im IR-Elutionsverlauf (**Abbildung 4.3**) zu sehen ist, die Ausläufer der Proteinfraktion mit weiteren Verunreinigungen behaftet sind. Insbesondere sei hier nochmals die in **Kapitel 4.2.1** unbekannte Proteinfraktion erwähnt, welche direkt nach CanA bzw. K₁-CanA eluiert. Diese oligomeren Proteine sind nicht in der Lage durch SDS-Gele zu diffundieren, haben jedoch auf NMR-Messungen unerwünschte Nebeneffekte. Durch eine anschließende Gelfiltration lässt sich hingegen das Protein CanA bzw. K₁-CanA in einem äußerst hohen Reinheitsgrad isolieren (siehe **Abbildung 4.4**). Durch die Einführung der Salzgradientenelution konnten bis zu 20 bis 40 mg reinstes, ungelabeltes CanA bzw. K₁-CanA aus einem Liter LB₀-Medium nach den optimierten Reinigungsschritten gewonnen werden. Bei isotopenmarkiertem ¹³C-¹⁵N-CanA bzw. ¹³C-¹⁵N-K₁-CanA betrugen die Ausbeuten pro Liter Minimalmedium mit nur 1 g ¹⁵NH₄Cl und 2 g ¹³C-Glucose immerhin noch 5 bis 15 mg.

Das erneute Auftreten der unbekannten Proteinfraktion bei der Ionenaustauschchromatographie von dem Expressionsansatz von CanA ohne IPTG Zugabe (siehe **Abbildung 4.5**) legt den Schluss nahe, dass es sich hierbei wohlmöglich um einen Bestandteil der *E. coli* Bakterien bzw. des Plasmids handelt. Trotz der geringen Konzentration an CanA war die Konzentration der unbekannten Proteinfraktion nahezu unverändert im Vergleich zur herkömmlichen Expression von CanA mit IPTG-Zugabe. Diesbezüglich ist eine Bindung der unbekannten Proteinfraktion an CanA eher unwahrscheinlich. Da diese spezielle Proteinfraktion nur bei der Reinigung von *E. coli* Stämmen mit CanA bzw. K₁-CanA beobachtet worden ist bei der ein Hitzeschritt durchgeführt wurde, liegt der Schluss nahe, dass entweder das eingeschleuste Plasmid von CanA, oder der Hitzeschritt an sich - was eher wahrscheinlich ist - diesen Effekt hervorgerufen hat. Die

Transmissions-Elektronen-Mikroskopie Aufnahmen dieser Proteinfraktion zeigten große, amorphe Proteinoligomere (**Abbildung 4.31**). Einheitliche strukturelle, visuelle Merkmale konnten trotz diverser Aufnahmen nicht ermittelt werden. Ebenso lieferte eine N-terminale Ansequenzierung über Edmann-Abbau keine einheitliche Anfangssequenz der Oligomere. Erstaunlich ist jedoch, dass die Oligomere stets in Lösung blieben und trotz ihrer Größe nicht ausfielen. Die Proteinfraktion ließ sich zwar von den Säulen bei der Reinigung eluieren, jedoch konnte keine Diffusion bzw. Auftrennung der Proteinfraktion durch SDS-PAGE erreicht werden. Sowohl die Bestimmung der molekularen Masse über SDS-PAGE, als auch über die Massenspektrometrie lieferten keine weiteren verwertbaren Ergebnisse.

5.2 Zustands- und Sekundärstrukturbestimmungen von CanA, polymerisiertem CanA und K₁-CanA

Da in der NMR zur Strukturbestimmung diverse Langzeitmessungen über mehrere Tage unumgänglich sind, ist es von größter Wichtigkeit, die Messbedingungen für ein Protein so zu wählen, dass der Zustand des Proteins selbst über längere Zeit einheitlich bleibt. Wie die Messungen der dynamischen Lichtstreuung (siehe **Kapitel 4.7**) die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie Aufnahmen (siehe **Abbildung 4.27**) und die Diffusionsmessungen (siehe **Kapitel 4.10**) von CanA zeigten, neigt CanA selbst ohne Induzierung durch zweiwertige Kationen zu einer langsam voranschreitenden Eigenpolymerisation.

Die ersten Diffusionsmessungen zur Bestimmung des nativen Aggregationszustandes von CanA bei verschiedenen pH Werten ergaben bei pH = 6 eine molekulare Masse von 64.63 kg/mol und bei pH = 9 eine molekulare Masse von 28.20 kg/mol (siehe **Abbildung 4.32**).

Wie Bianca Mai [43] anderweitig feststellte, scheint der pH Wert einen enormen Einfluss auf die Aggregations- bzw. Polymerisationseigenschaften von CanA zu besitzen. Laut ihren Ergebnissen begünstigt ein eher saurer pH Wert die Polymerisierung von CanA. In der Praxis ist hierbei jedoch zu beachten, den pH Wert

nicht unter 5.5 einzustellen, da das Protein sonst reversibel auszufallen beginnt. Zur Kontrolle der Messreihe wurden die Messungen nochmals durchgeführt und weitere unabhängige Proben mit $\text{pH} = 6$ und 9 vermessen. Die Diffusionskontrollmessung der zu Beginn gemessenen Probe mit einem pH Wert von 9 ergab nach einer Verweildauer von ca. 4 h bei RT eine neue molekulare Masse von 40.15 kg/mol . Ebenso brachten die Vermessungen der neu hergestellten Proben zwar ähnliche, allerdings nicht identische molekulare Massen hervor. Diese Feststellungen ließen eine voranschreitende Eigenpolymerisation von CanA vermuten, bei der die ermittelte molekulare Masse eines CanA Monomers durch die Anwesenheit weiterer Aggregatzustände verfälscht wird. Nach einer Gelfiltration zur Abtrennung der Oligomere ergab die Diffusionsmessung der gleichen Probe mit $\text{pH} = 9$ eine molekulare Masse von 22.31 kg/mol (siehe **Abbildung 4.33**). Das Signal zu Rauschen Verhältnis vor und nach der Gelfiltration blieb weitestgehend konstant. Dies weist deutlich darauf hin, dass die Diffusionsmessungen durch größere Proteinaggregate beeinflusst wurden, was zu einer Erhöhung der experimentell ermittelten molekularen Masse führte. Da das Signal zu Rauschen Verhältnis gleich blieb, kann davon ausgegangen werden, dass nur ein verschwindend geringer Teil des monomeren CanA aggregierte, da die Signalintensität abhängig von der Proteinkonzentration ist. Nach der Abtrennung der CanA Polymere erreichte die durch das Experiment ermittelte molekulare Masse 22.31 kg/mol . Die anhand des Einzelgewichts der Atome errechnete molekulare Masse von monomeren CanA beträgt 19.85 kg/mol .

Diesbezüglich kann davon ausgegangen werden, dass der native, unpolymerisierte Aggregationszustand von CanA im monomeren Bereich einzuordnen ist. Die geringe Differenz zwischen der theoretischen und der experimentell ermittelten molekularen Masse kommt durch die Eigenpolymerisation von CanA zu größeren Oligomeren zustande, welche durch eine längere Verweildauer und einen niedrigen pH Wert begünstigt wird.

Ebenso weist der durch die experimentellen Daten berechnete hydrodynamische Radius R_h von 1.68 nm bei $\text{pH } 9$ auf einen nativen, monomeren Zustand von CanA hin.

Diese Aussage unterstützt ebenso die Auswertung der durch die Dynamische Lichtstreuung erhaltenen Daten. Hierbei ergab sich für CanA bei unterschiedlichen pH Werten (pH = 6 bzw. pH = 9), eine nahezu identische Hauptpartikelgröße von 3.38 nm bzw. 3.48 nm mit einem Volumenanteil von über 99.9%.

Die bei der Dynamischen Lichtstreuung weiteren durch die Eigenpolymerisation auftretenden Hauptoligomer-Fraktionen mit gemittelten Durchmessern von ca. 54 nm und 283 nm, machten zusammen unter 0.1% des Gesamtvolumens aus (siehe **Abbildung 4.23** und **Abbildung 4.24**).

Der Literaturwert des minimalen Radius eines globulären, monomeren Proteins mit einem molekularen Gewicht von ca. 20 kDa beträgt 1.78 nm. Hieraus ergibt sich ein theoretischer, minimaler Durchmesser von 3.56 nm [34].

Die **Tabelle 4** gibt einen Überblick über die anhand der verschiedenen Messmethoden erhaltenen hydrodynamischen Radien R_h und die Partikeldurchmesser d von CanA, im Vergleich zu literarischen Durchschnittswerten eines gefalteten monomeren Proteins mit ca. 20 kDa [34] bzw. zur Berechnung eines Proteins mit 182 Aminosäuren nach Wilkins [36] wieder.

	Diffusions- messungen	Dynamische Lichtstreuung	Durchschnitts- wert Literatur	Berechnung nach Wilkins
R_h [nm]	1.68	1.74	1.78	1.48 - 2.94
d [nm]	3.36	3.48	3.56	2.96 - 5.88

Tabelle 4: Durch Diffusionsmessungen bzw. durch Dynamische Lichtstreuung erhaltene hydrodynamische Radien R_h bzw. Partikeldurchmesser d von CanA, im Vergleich zum Literaturwert für ein Protein mit 20 kDa [34] bzw. zur Berechnung nach Wilkins mit $N = 182$ [36]

CanA ist anhand seiner gemessenen Partikelgröße von 3.36 bzw. 3.48 nm und seinem hydrodynamischen Radius von 1.68 bzw. 1.74 nm somit vom Aggregationszustand als Monomer einzuordnen.

Die Differenzen beim Messen des Durchmessers über die Volumenverteilung bei der dynamischen Lichtstreuung nehmen bedingt durch die Messmethode mit zunehmender Partikelgröße und der immer weniger globulären Struktur der Oligomere und der daraus resultierenden ungleichen Lichtstreuung stetig zu. Somit sind die Durchmesser der weiteren auftretenden Hauptoligomerfraktionen eher als grober Richtwert für die Größe der Oligomere zu sehen. Dennoch kann hierdurch eine eindeutige Aussage getroffen werden. Nach der Reinigung des Proteins und zu Beginn der Messreihe lag CanA quantitativ zu 99.9% monomer vor. Trotz der Vermeidung zweiwertiger Kationen bei der Expression und der Reinigung des Proteins, sowie dem Einsatz von EDTA um eventuell vorhandene zweiwertige Kationen zu komplexieren, war CanA in der Lage Oligomere zu bilden.

Es konnte über die Dynamische Lichtstreuung festgestellt werden, dass diese Eigenpolymerisation allem Anschein nach über mittelgroße Oligomere Zwischenstufen zu größeren Polymerstrukturen stattfindet.

Die Eigenpolymerisierung von CanA ist im Gegenzug zur induzierten Polymerisation durch zweiwertige Kationen kein schneller, exponentieller, sondern ein eher schleichender Prozess.

Auch die Transmissions-Elektronen-Mikroskopie Aufnahmen (siehe **Abbildung 4.27**) welche vorwiegend ein starkes Hintergrundrauschen bei Nichtinduzierung der Polymerisation durch zweiwertige Kationen wiedergeben, weisen auf eine hohe Konzentration an nicht polymerisierten Protein hin. Trotz mehrfacher Wiederholungen der Messungen mit verschiedenen unabhängigen Protein Präparationen unter Zugabe von EDTA konnten bei einer Nichtinduzierung nur wenige vereinzelte, jedoch keine größeren Cluster von Cannulae wie bei einer Induzierung (siehe **Abbildung 4.28**) beobachtet werden. Das Vorhandensein dieser vereinzelt Cannulae trotz der EDTA Zugabe weist wiederum auf die eigenständige Polymerisation von CanA hin, welche mit der Zeit stetig zunimmt.

Da die nicht induzierte Eigenpolymerisation von CanA für NMR Langzeitmessungen kontraproduktiv ist, wurde (wie in **Kapitel 4.3** bis **Kapitel 4.5** beschrieben) versucht, Proteinkonstrukte von CanA zu finden, die keine Polymerisierungseigenschaften

zeigten. Diese Konstrukte sollten jedoch bis auf die Polymerisierungseigenschaften in ihrer Struktur und ihren sonstigen Grundeigenschaften mit CanA einheitlich bleiben. Aufgrund der natürlichen Schnittstellen des Trypsinverdaus von CanA (siehe **Kapitel 4.4**) wurden Konstrukte von CanA kloniert, die Plasmide in kompetente Zellen transferiert und anschließend exprimiert. Die Konstrukte wurden anschließend in mehreren Verfahren bezüglich ihren Eigenschaften und ihrer Struktur mit CanA verglichen.

Da das Konstrukt K₁-CanA, welches nur 10 Aminosäuren im N-terminalen Bereich weniger als CanA besaß, keine Polymerisationseigenschaften mehr aufwies und dem ursprünglichen Protein CanA von seinem Aufbau und den übrigen physikalischen Eigenschaften fast exakt glich (siehe **Kapitel 4.5**), wurde nur das Konstrukt K₁-CanA weiter verfolgt. Konstrukte wie z.B. das Konstrukt K₂-CanA, welches ebenfalls keine Polymerisationseigenschaften mehr aufwies, jedoch ebenso seine hypothermophilen Eigenschaften verlor, wurden verworfen.

Das Einbüßen der Polymerisationsfähigkeit (sowohl induziert durch zweiwertige Kationen, als auch die Eigenpolymerisationseigenschaften von ursprünglichem CanA) war für Langzeit-NMR-Messungen von enormen Vorteil. Hierdurch konnte man nicht nur von einer einheitlichen Struktur des monomeren Konstrukts von CanA über die komplette Messdauer ausgehen, sondern auch die durch die Oligomere des Proteins hervorgerufene Linienverbreiterung vermeiden. Durch die Stabilisierung des Proteins konnten somit längere und detailliertere Messreihen bei hohen Temperaturen durchgeführt werden.

Anhand verschiedener, unabhängiger Messmethoden konnte gezeigt werden, dass CanA und K₁-CanA in ihrem Aufbau und ihren Strukturmerkmalen so gut wie identisch sind.

Die CD-Spektroskopie lieferte hierzu eindeutige Ergebnisse, bei denen die verschiedenen Strukturelemente beider Proteine um max. 1% variierten (siehe Strukturelementeaufstellung **Kapitel 4.6**). Die graphische Darstellung der Messreihe zeigt eine so gut wie eindeutige Übereinstimmung beider Messkurven über den aussagekräftigen Wellenbereich von 205 bis 260 nm (siehe **Abbildung 4.22**).

Diesbezüglich ist davon auszugehen, dass die so gut wie identischen Sekundären Strukturelemente beider Proteine auf eine nahezu gleiche Tertiär Struktur der Proteine CanA und K₁-CanA hindeuten.

Ein vergleichendes HSQC von K₁-CanA und CanA (siehe **Abbildung 4.58**) zeigte eine nahezu vollständige Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen der Stickstoffatome und den dazugehörigen Protonen der Peptidbindungen im Rückgratbereich beider Proteine. Eine vollständige zum Vergleich mit K₁-CanA heranziehbare Zuordnung des Proteinrückgrats von CanA konnte jedoch nicht erreicht werden. Der Grund hierfür lag im geringeren Signal zu Rauschen Verhältnis, hervorgerufen durch die Eigenpolymerisierung von CanA durch die langen Messzeiten bei den 3D Experimenten. Desweiteren führte die experimentell bedingte, geringere Isotopenmarkierung von CanA, im Vergleich zu K₁-CanA, zu einer deutlich geringeren Signalintensität. Jedoch zeigten die auswertbaren Bereiche der mit beiden Proteinen durchgeführten 3D Experimente äußerst starke Analogien im Bezug auf die chemischen Verschiebungen der Kohlenstoffe des Rückgrats, mit nur selten auftretenden minimalen Abweichungen.

Da die chemischen Verschiebungen des Rückgrats einen äußerst starken Einfluss auf die Strukturrechnung eines Proteins haben, liegt die Annahme nahe, dass bei einer Übereinstimmung der chemischen Verschiebungen bzw. gleichen Sekundärstrukturelementen, auch eine nahezu gleiche Tertiärstruktur der Proteine K₁-CanA und CanA vorausgesetzt werden kann.

Um einen Vergleich der Sekundärstrukturen von polymerisierten und unpolymerisierten CanA zu erhalten wurden FT-IR Messungen wie in **Kapitel 4.8** beschrieben durchgeführt. Da CanA bei der Polymerisation mit einem deutlichen Niederschlag ausfällt und somit im Gegensatz zu unpolymerisierten CanA nicht mehr in Lösung bleibt, ist die FT-IR eine der wenigen Messmethoden, bei der überhaupt ein schneller Vergleich der Sekundärstruktur anhand eines getrockneten Proteinfilms möglich ist.

Da bei der FT-IR eine genaue, detaillierte Analyse der Strukturbereiche im wässrigen Milieu nur mit einer speziellen, dafür vorgesehenen Versuchsanordnung möglich ist

und sich das zu untersuchende Protein in Lösung befinden muss, konnte nur eine qualitative Aussage über die Sekundärstruktur beider Proteine mittels einem getrockneten Proteinfilm getroffen werden.

Der für die Sekundärstruktur aussagekräftigste Bereich eines FT-IR Spektrums zwischen 1450 und 1750 cm^{-1} zeigte hierbei eine fast vollkommene Übereinstimmung beider Spektren (siehe **Abbildung 4.25**). Die speziell für die Sekundärstruktur wichtige Amid-I- und Amid-II-Bande von CanA (**rot**, unten) und polymerisiertem CanA (**blau**, oben) haben einen fast exakt gleichen Verlauf, der auf die gleiche Sekundärstruktur hindeutet (**Abbildung 4.26**). Einzig die Amid-II-Bande bei 1609 cm^{-1} weist eine leichte Änderung der Signalintensität auf, was hauptsächlich eine leichte Änderung der N-H- und C-N-Streckschwingungen bedeutet. Die Amid-I-Bande welche nur durch die C=O-Streckschwingungen bei Proteinen hervorgerufen wird, ist allerdings bedeutend aussagekräftiger von beiden Amid-Banden im Bezug auf einen Vergleich der Sekundärstruktur, da die C=O-Streckschwingungen des Rückgrats in direkter Korrelation zur Sekundärstrukturinformation stehen. Das starke Signal der Amid-I-Bande bei 1635 cm^{-1} ist charakteristisch für C=O-Streckschwingungen der Peptidbindungen mit einer stark ausgeprägten β -Faltblattstruktur.

Aufgrund des Vergleichs der Proteinfilme kann davon ausgegangen werden, dass die Grundstruktur von CanA bei der Polymerisation zu Cannulae weitestgehend bestehen bleibt. Die beste Methode zu weiteren, vergleichenden Untersuchungen zwischen dem monomeren und dem polymerisierten Zustand, würde hierbei die Kristallographie bieten.

Wie in **Kapitel 4.3** beschrieben, wurde bei der Titration von CanA mit CaCl_2 und der damit verbundenen Polymerisationsinduktion festgestellt, dass einige ^{15}N Signale in den $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -sofast-HMQC-Spektren trotz allgemeiner Signalintensitätsabnahme von der Polymerisation sowohl in ihrer chemischen Verschiebung als auch in ihrer Signalintensität unbeeinflusst blieben. Ein Vergleich der $(^1\text{H}-^{15}\text{N})$ -sofast-HMQC-Spektren von CanA und K_1 -CanA mit einer CaCl_2 -Gesamtkonzentration von 6.4 mM nach ca. 11 h (**Abbildung 4.12**, **Abbildung 4.13**, **Abbildung 4.14** und **Abbildung 4.15**) zeigte, dass sowohl die chemischen Verschiebungen als auch die

Signalintensitäten der Peaks **A, B, C, D, E, F, G, H, I** und **J** konstant blieben. Dies deutet darauf hin, dass die zu den ^{15}N Signalen zugehörigen Aminosäuren bzw. deren Seitenketten von der Umstrukturierung von CanA zu Cannulae unbeeinflusst bleiben. Die vermutlich frei beweglich auf einer der Oberfläche des Proteins liegenden Aminosäuren bzw. deren Seitenketten dürfen in den zu Cannulae organisierten Polymeren keine Kontakte zu weiteren CanA Untereinheiten aufweisen und liegen somit vermutlich auf der Außenseite der Cannulae. Die Peaks **A, G** und **E** sind bei den Spektren von $\text{K}_1\text{-CanA}$ nicht vorhanden. Diese ^{15}N -Signale sind mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit in dem im Vergleich zu $\text{K}_1\text{-CanA}$ um 10 Aminosäuren längeren N-Terminus von CanA lokalisiert. Dies deutet darauf hin, dass der N-Terminus von CanA selbst im stark strukturierten, polymerisierten Zustand von CanA flexibel bleibt. Er ist somit an der Oberfläche des Proteins lokalisiert, welche im Polymer keine Kontaktflächen zu anderen CanA Untereinheiten aufweist.

Diese These unterstützen auch die Oberflächenanalysen aus den ersten Strukturrechnungen. Wie in **Abbildung 4.56** und **Abbildung 4.63** zu sehen ist, befindet sich der frei bewegliche N-Terminus beginnend mit der Aminosäure **A1** im Anschluss einer Seitenoberfläche, welche keinerlei weiteren Kontaktpunkte zwischen den Proteinuntereinheiten aufweist. Fünf der Sechs möglichen Außenflächen weisen hingegen jedoch eindeutige und großflächige Kontaktstellen auf.

5.3 Bindungsstellen von $\text{K}_1\text{-CanA}$ bzw. CanA und die damit verbundenen Rückschlüsse auf die Struktur

Die Proteine $\text{K}_1\text{-CanA}$ bzw. CanA wurden mit den zur induzierten Polymerisation notwendigen zweiwertigen Kationen Ca^{2+} (siehe **Abbildung 4.34** und **Abbildung 4.38**) bzw. Mg^{2+} (siehe **Abbildung 4.35** und **Abbildung 4.39**) mit zunehmender Salzkonzentration titriert. Durch die Änderungen der chemischen Verschiebungen der ^1H - ^{15}N -Signale in den gemessenen HSQCs, lassen sich somit die für die induzierte Polymerisation notwendigen Bindungsstellen der zweiwertigen Kationen in den Proteinen $\text{K}_1\text{-CanA}$ bzw. CanA ermitteln.

Sowohl K₁-CanA als auch CanA besitzen eine eindeutige Bindungsstelle im Bereich der Aminosäuren **K104** und **E105**, welche im Vergleich zu den restlichen chemischen Verschiebungen signifikant hohe Änderungen ihrer chemischen Verschiebungen aufweisen (siehe **Abbildung 4.36**, **Abbildung 4.37**, **Abbildung 4.40** und **Abbildung 4.41**). Diese Bindungsstelle ist direkt in der kleineren α -Helix des Proteins lokalisiert, welche sich zwar außerhalb der zwei β -Faltblattebenen befindet, jedoch im sofortigen Anschluss an das β -Faltblatt $\beta 7$ folgt (siehe **Abbildung 4.69**).

Des weiteren weisen die Bereiche in räumlicher Nähe zur Bindungsstelle **K104** und **E105** deutliche Änderungen in ihren chemischen Verschiebungen auf. Da die Bindungskonstanten für die Aminosäurenbereiche 84 - 89, 72 - 73, 170 - 172, 43 - 49, 100 - 102 und 103 - 108 nahezu gleich groß sind (K_D (K₁-CanA; CaBS1) = 0.774 +/- 0.046 mM), liegt die Vermutung nahe, dass es sich hierbei um die räumliche Umgebung einer einzigen Ca²⁺ / Mg²⁺-Bindungsstelle handelt. Die dabei signifikant unterschiedliche Bindungskonstante des Aminosäurenbereichs 21 - 33 (K_D (K₁-CanA; CaBS2) = 10.7 +/- 2.2 mM) deutet auf eine zweite Bindungsstelle hin. Die **Abbildung 5.1** gibt eine schematische zweidimensionale Darstellung der Sekundärstruktur von CanA bzw. K₁-CanA wieder, wobei die sich durch die Titration ändernden Bereiche (**gelb**) und die primären Bindungsstellen (**rot**) markiert wurden.

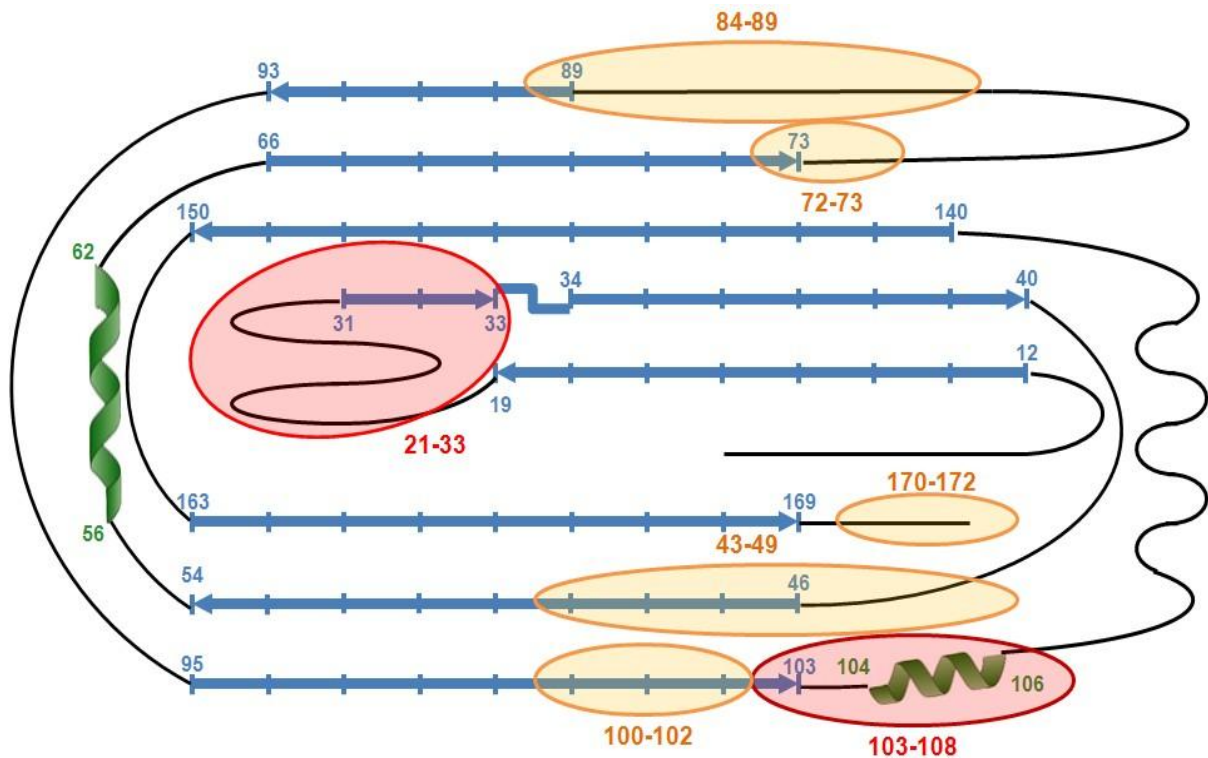


Abbildung 5.1: Schematische Darstellung einer ersten Sekundärstrukturvorhersage von K₁-CanA bzw. CanA mit Markierungen der sich bei der Titration mit Ca²⁺ bzw. Mg²⁺ ändernden chemischen Verschiebungen ¹H und ¹⁵N von CanA bzw. K₁-CanA; β-Faltblätter wurden **blau**, α-Helices **grün**, random coil sowie loops **schwarz**, die primäre Bindungszentren **rot** und die sich ebenfalls ändernden Aminosäurebereiche **gelb** dargestellt.

Wie der Abbildung zu entnehmen ist, ändern sich bei der Titration vor allem die eher flexiblen Bereiche des Proteins, während die zwei starren β-Faltblattebenen weitestgehend unverändert bleiben. Anhand der Änderungsbereiche ließ sich bereits vor der fertigen Strukturrechnung eine Aussage über die Anordnung der beiden Ebenen treffen. Die chemischen Verschiebungen des Bereiches 84 - 89 bzw. 72 - 73 lassen vermuten, dass diese Bereiche nahe dem Bindungszentrum von 103 - 108 angeordnet sein und somit die beiden Ebenen zumindest in diesem Bereich nahe bei einander liegen müssen. Dieser Befund lässt eine geometrische Faltebene zwischen den beiden großen β-Faltblattebenen vermuten welche in **Abbildung 5.2** farblich gekennzeichnet wurde.

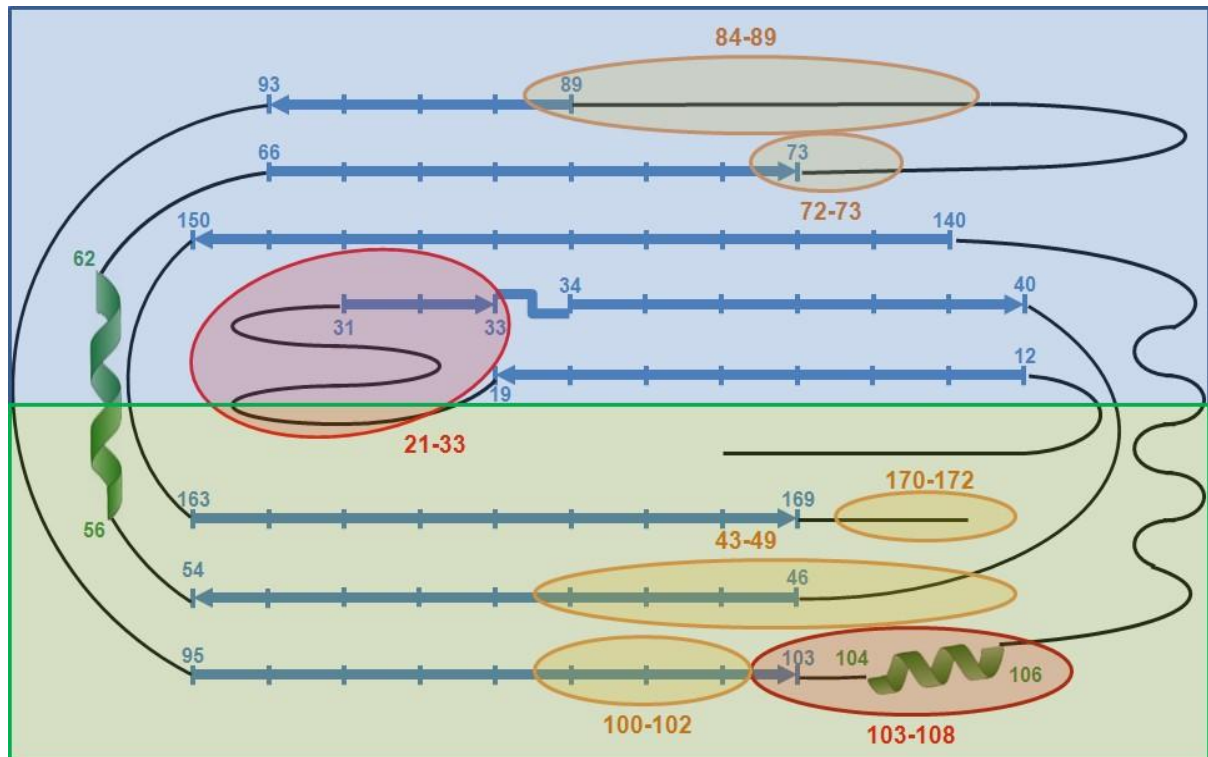


Abbildung 5.2: Schematische Darstellung einer ersten Sekundärstrukturvorhersage von K₁-CanA bzw. CanA mit farblicher Markierung der Bindungszentren und der möglichen geometrischen Faltebene zwischen den starren β -Faltblattebenen

Bei genauerer Betrachtung der flexiblen Bereiche zwischen den beiden Faltebenen im linken Bereich der Darstellungen wird deutlich, dass die flexiblen Bereiche von der Anzahl ihrer Aminosäuren und damit von ihrer Länge her zunehmen. Bei einer Faltung der beiden großen β -Faltblattebenen um die erwähnte geometrische Faltebene würde somit entweder eine keilförmige Aneinanderlagerung der Ebenen bzw. eine Art Hohlzylinder mit 2 β -Faltblattwänden entstehen. Beide Faltmöglichkeiten wären eine plausible Erklärung für die Änderung der chemischen Verschiebung der erwähnten Aminosäurebereiche bei der Zugabe von Ca^{2+} bzw. Mg^{2+} . Die **Abbildung 5.3** und **Abbildung 5.4** geben eine schematische Darstellung dieser Faltung und der Hypothesen wieder.

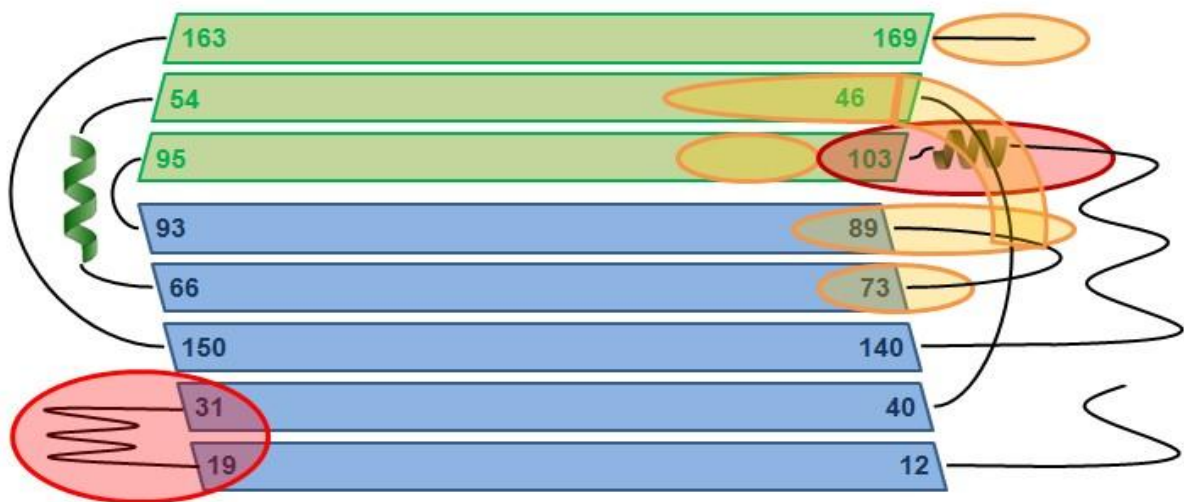


Abbildung 5.3: Schematische Darstellung der ersten möglichen Sekundärstrukturvorhersage von K₁-CanA bzw. CanA mit farblicher Markierung der Bindungszentren (**rot**). Die Abstände und Längen der Strukturbereiche, sowie die Lage der random coil Bereiche und der Winkel zwischen den β -Faltblattebenen wurde nur schematisch dargestellt

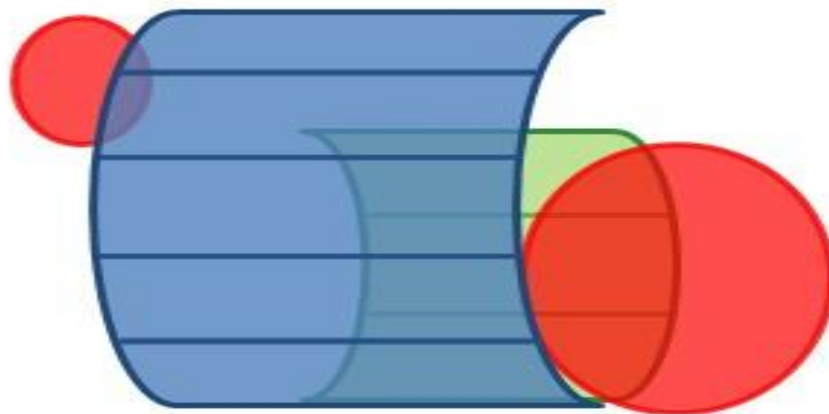


Abbildung 5.4: Schematische Darstellung der zweiten möglichen Sekundärstrukturvorhersage von K₁-CanA bzw. CanA mit farblicher Markierung der Bindungszentren (**rot**). Hierbei bilden die 2 β -Faltblattebenen eine Art β -Faltblatt-Barrel aus. Die Abstände, Längen und die Krümmung der Strukturbereiche wurde nur schematisch dargestellt.

Die Struktur eines β -Faltblatt-Barrels wie in **Abbildung 5.4** dargestellt erscheint im Bezug auf sämtliche gewonnen Informationen über die Sekundärstruktur von

K₁-CanA am plausibelsten und wurde durch die Strukturvorhersage durch CNS bestätigt.

5.4 Die Struktur von K₁-CanA

Sowohl die Sekundärstrukturvorhersagen der Circular dichroismus-Spektroskopie (**Kapitel 4.6**), die Ergebnisse der Bindungszentren (**Kapitel 5.3**), die Aussagekraft der NMR-Daten der Wasserstoffbrücken bzw. der NOE-Kontakte zwischen den einzelnen Strukturelementen (siehe **Anhang**) ergänzen und bestätigen das Ergebnis der vorläufigen NMR-Strukturrechnung.

Der große β -Faltblattanteil der CD-Vorhersage von K₁-CanA findet sich in 2 großen, miteinander verbundenen Faltblattebenen zu 3 bzw. 5 antiparallelen β -Faltblattsträngen wieder. Diese Faltblattebenen stehen sich gegenüber und bilden somit eine Art β -Faltblatt-Barrel aus. An den zwei Enden des β -Faltblatt-Barrels befindet sich jeweils ein unterschiedlich affines, aktives Zentrum zur Bindung von Ca²⁺ bzw. Mg²⁺. Ein weiteres aktives und essenzielles Zentrum für die Polymerisation von CanA bildet hierbei der N-Terminus des um 10 Aminosäuren längeren Proteins CanA. Der N-Terminus von K₁-CanA wie auch CanA befindet sich an der Außenoberfläche des Proteins.

6 Zusammenfassung

Diese Arbeit beschäftigt sich mit dem aus *Pyrodictium abyssi* isolierten Protein CanA, welches in der Lage ist, ein hitzebeständiges, nicht denaturierbares, organisches Hohlfasernetzwerk zu bilden. Die industriellen Einsatzmöglichkeiten wie z.B. als sich selbst polymerisierende Membranen, stereospezifisch durchlässige Hohlfaserkanäle, Stoff fixierende Nanoröhren oder sogar als organische Leiter sind nahezu grenzenlos. Für den spezifischen Einsatz eines solchen Proteins sind jedoch Modifikationen, sowie genaue Kenntnisse über das Polymerisationsverhalten, die Proteinstruktur und die Interaktionsstellen des Proteins von Nöten.

Das Ziel dieser Arbeit war es, mit Hilfe unterschiedlicher analytischer und spektroskopischer Methoden detaillierte strukturelle und biochemische Informationen über das Protein CanA und sein Polymerisationsverhalten zu erhalten.

Das Protein CanA unterliegt nicht nur einer induzierten Polymerisation, sondern auch einer voranschreitenden Eigenpolymerisation. Daher war es für die Strukturaufklärung von größter Wichtigkeit, ein Konstrukt dieses Proteins zu entwickeln, welches bis auf die Polymerisierungsfähigkeit sämtliche strukturellen und physikalischen Eigenschaften von CanA beibehielt. Dieser Durchbruch gelang mit einem nur um 10 Aminosäuren verkürzten Protein Konstrukt namens K₁-CanA. Desweiteren konnte die in-vitro Expression von unmarkiertem CanA bzw. K₁-CanA in Hinsicht auf die Ausbeute und den Reinheitsgrad des isolierten Proteins durch einen veränderten Zellaufschluss und optimierte Reinigungsschritte enorm gesteigert werden. Zur Erreichung der gesetzten Ziele musste bewiesen werden, dass sowohl K₁-CanA, CanA, wie auch dessen Polymere eine nahezu identische Struktur besitzen. Die strukturelle Gleichheit des Polymers mit dem Monomer CanA wurde mittels Fourier-Transformations-Infrarotmessungen bewiesen. Durch Circular dichroismus-Spektroskopie-Experimente konnte gezeigt werden, dass CanA und K₁-CanA eine identische Sekundärstruktur (5% α -Helix, 41% β -Faltblatt, 53% coil) besitzen. Ein Vergleich der ¹⁵N-Signale durch 2D NMR Messungen zeigte eine nahezu identische chemische Umgebung aller vorkommenden Aminosäuren der Proteine CanA und K₁-CanA. Diesbezüglich konnte sowohl für K₁-CanA, CanA und dessen Polymer eine einheitliche Sekundärstruktur bewiesen werden. Mit Hilfe der

dynamischen Lichtstreuung konnte die Partikelgröße von monomeren CanA mit 3.38 nm bzw. 3.48 nm bestimmt werden. Diese Partikelgrößenverhältnisse bestätigten auch die durchgeführten NMR-Diffusionsmessungen, bei denen CanA als Monomer im nativen Zustand mit einem hydrodynamische Radius R_h von 1.68 nm klassifiziert wurde. Die Eigenpolymerisation, sowie die Polymerisierungseigenschaften von CanA zu Cannulae bzw. die nicht vorhandenen Polymerisationsfähigkeiten von K_1 -CanA, wurden durch Transmissions-Elektronenmikroskopie Messungen dokumentiert. Die synthetisierten Cannulae entsprachen in ihrer Form und den Dimensionen (Durchmesser ca. 30 nm) in etwa den natürlichen Cannulae im Netzwerk von *Pyrodictium abyssi*. Trotz der für die NMR kritischen Größe von 18.7 kDa des Proteins K_1 -CanA, wurden nahezu sämtliche chemischen Verschiebungen über verschiedenste 2D und 3D NMR Messungen identifiziert. Hierdurch konnten definitive Aussagen über die Sekundärstruktur des Proteins getroffen werden. Die über TALOS+ bestimmte Abfolge der Sekundärstrukturelemente von K_1 -CanA lautet $\beta\beta\beta\alpha\beta\beta\beta\alpha\beta\beta\beta\beta\beta$ (6% α -Helix, 44% β -Faltblatt und 50% coil). Der größte Teil der β -Faltblätter von K_1 -CanA ist in 2 großen, miteinander verbundenen Faltblattebenen zu 3 bzw. 5 antiparallelen β -Faltblattsträngen koordiniert. Diese Faltblattebenen stehen sich gegenüber und bilden ein β -Faltblatt-Barrel. Anhand von (^1H - ^{15}N -) *sofast*-HMQC-Spektroskopie-Messungen konnten die zur induzierten Polymerisation benötigten $\text{Ca}^{2+} / \text{Mg}^{2+}$ Bindungsstellen identifiziert und die Bindungskonstanten bestimmt werden. Die Bindungsstellen befinden sich jeweils an den flexiblen Enden des β -Faltblatt-Barrels. Sowohl bei K_1 -CanA als auch bei CanA ist die Bindungsstelle 1 mit $K_D(K_1\text{-CanA}) = 0.774 \pm 0.046$ mM bzw. $K_D(\text{CanA}) = 1.00 \pm 0.06$ mM im Vergleich zur Bindungsstelle 2 mit $K_D(K_1\text{-CanA}) = 10.7 \pm 2.2$ mM bzw. $K_D(\text{CanA}) = 15.1 \pm 1.8$ mM deutlich Calcium affiner. Im Bezug auf Magnesium besitzen beide Bindungszentren die gleiche Affinität - Bindungsstelle 1: $K_D(K_1\text{-CanA}) = 3.19 \pm 0.35$ mM bzw. $K_D(\text{CanA}) = 3.90 \pm 0.11$ mM; Bindungsstelle 2: $K_D(K_1\text{-CanA}) = 3.18 \pm 0.62$ mM und $K_D(\text{CanA}) = 3.85 \pm 0.24$ mM. Die gewonnenen NMR Daten wurden anschließend in einer Strukturrechnung über CNS verwendet und ermöglichten eine erste Strukturrechnung des Proteins K_1 -CanA. Anhand dieser Struktur konnte gezeigt werden, dass jede CanA Untereinheit in einem Cannulae an 5 seiner 6 seitigen Oberfläche Kontaktpunkte zu weiteren CanA Untereinheiten aufweist. Der flexible, zur Polymerisation benötigte N-Terminus von CanA ist hierbei

auf der Seite ohne weitere Kontaktflächen lokalisiert. Die Sekundärstrukturinformation aller in dieser Arbeit verwendeten Messmethoden stimmten mit der durchgeführten Berechnung der Struktur überein.

7 Abkürzungsverzeichnis

1D	eindimensional
2D	zweidimensional
3D	dreidimensional
¹ H	Wasserstoff mit Massenzahl 1
¹³ C	Kohlenstoff mit Massenzahl 13
¹⁵ N	Stickstoff mit Massenzahl 15
°C	Grad Celsius, Temperatureinheit
Aminosäuren:	A (Ala) Alanin, I (Ile) Isoleucin, R (Arg) Arginin, C (Cys) Cystein, K (Lys) Lysin, S (Ser) Serin, D (Asp) Asparaginsäure, L (Leu) Leucin, T (Thr) Threonin, E (Glu) Glutaminsäure, M (Met) Methionin, V (Val) Valin, F (Phe) Phenylalanin, N (Asn) Asparagin, W (Trp) Tryptophan, G (Gly) Glycin, P (Pro) Prolin, Y (Tyr) Tyrosin, H (His) Histidin, Q (Gln) Glutamin
APS	Ammoniumpersulfat
CD	Circulardichroismus
COSY	<i>Correlated Spectroscopy</i>
d	Durchmesser
D	Diffusionskonstante
Da	Dalton
DLS	Dynamische Licht Streuung
DSS	2,2-Dimethyl-2-Silapentan-5-Sulfonat
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FT-IR	Fourier-Transformations-Infrarot-Spektroskopie
g	Gramm
h	Stunden
HSQC	<i>Heteronuclear Single Quantum Coherence</i>
Hz	Hertz, Zyklen pro Sekunde
IPTG	Isopropyl-β-D-1-thiogalaktosid
IR	infrarot
K	Kelvin, Temperatureinheit
K _D	Bindungskonstante

k	kilo-, 10^3
L	Liter
M	Stoffmengenkonzentration, mol/L
m	milli-, 10^{-3}
m	Meter
min	Minuten
n	nano-, 10^{-9}
NMM	New Minimal Medium
NMR	Kernspinresonanz (<i>Nuclear Magnetic Resonance</i>)
NOE	<i>Nuclear Overhauser Effect</i>
NOESY	<i>Nuclear Overhauser Enhancement and Exchange Spectroscopy</i>
N-Terminus	freies Aminogruppenende einer Polypeptidkette
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei $\lambda = 600$ nm
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
ppm	10^{-6} (<i>parts per million</i>)
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>rounds per minute</i>)
R _h	hydrodynamischer Radius
RT	Raumtemperatur
s	Sekunden
SDS	Natriumdodecylsulfat
sofast HMQC	<i>Selective Optimized Flip-Angle Short-Transient Heteronuclear Multiple Quantum Coherence</i>
T	Temperatur
TAG11	<i>Trans Atlantic Geotraverse 11</i>
TEM	Transmissions-Elektronenmikroskopie
TEMED	Tetramethylethyldiamin
TOCSY	<i>Total Correlation Spectroscopy</i>
TRIS	TRIS(hydroxymethyl)aminomethan
TROSY	<i>Transverse Relaxation Optimized Spectroscopy</i>
U	Enzymatische Aktivität in $\mu\text{mol/min}$ (<i>unit</i>)
UV	ultraviolett
V	Volt
δ	Chemische Verschiebung

μ	mikro-, 10^{-6}
λ	Wellenlänge

8 Literaturverzeichnis

1. R. M. Haymon, R. A. Koski and C. Sinclair, "Fossils of Hydrothermal Vent Worms from Cretaceous Sulfide Ores of the Samail Ophiolite, Oman", *Science* 30, Vol. 223 (4643), 1407 - 1409, (1984)
2. W. Martin, J. Baross, D. Kelley and M. J. Russell, "Hydrothermal vents and the origin of life", *Nature Reviews Microbiology* 6, 805 - 814, (2008)
3. P. A. Rona, G. Thompson, M. J. Mottl, J. A. Karson, W. J. Jenkins, D. Graham, M. Mallette, K. Von Damm and J. M. Edmond, "Hydrothermal activity at the Trans-Atlantic Geotraverse Hydrothermal Field, Mid-Atlantic Ridge crest at 26° N", *Journal of Geophysical Research: Solid Earth* (1978–2012) 89 (B13), 11365 - 11377, (1984)
4. H. W. Jannasch and M. J. Mottl, "Geomicrobiology of Deep-Sea Hydrothermal Vents", *Science* 23, Vol. 229 (4715), 717 - 725, (1985)
5. G. Thompson, S. E. Humphris, B. Schroeder, M. Sulanowska, and P. A. Rona, "Active vents and massive sulfides at 26 degrees N (TAG) and 23 degrees N (Snakepit) on the Mid-Atlantic Ridge", *Can. Mineral* 26, 697 - 711, (1988)
6. L. M. Parson, C. L. Walker and D. R. Dixon, "Hydrothermal vents and processes: Modelling diffuse hydrothermal flow in black smoker vent fields", *Geological Society, London, Special Publications* 87, 159 - 173, (1995)
7. D. M. Karl, "Microbiology of deep-sea hydrothermal vents", *CRC Press*, (1995)
8. W. Martin and M. J. Russell, "On the origins of cells: a hypothesis for the evolutionary transitions from abiotic geochemistry to chemoautotrophic prokaryotes, and from prokaryotes to nucleated cells", *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 358, 59 - 85, (2003)

9. K. O. Stetter, "Hyperthermophiles in the history of life", Phil. Trans. R. Soc. B. 361, 1837 - 1843, (2006)

10. W. Deininger, "Untersuchungen zur hitzeabhängigen Expression des Thermosoms bei *Pyrodictium* sowie Isolierung und Charakterisierung eines neuen Vertreters der Art *Pyrodictium abyssi* (TAG11) aus der Tiefsee"; Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, (1994)

11. J. Tucker, G. Sczakiel et al, "Expression of p21 preteins in escherichia coli and stereochemistry of the nucleotide-binding site", EMBO Journal 5 (6): 1351 - 1358, (1986)

12. G. Rieger, R. Rachel, R. Hermann and K. O. Stetter; "Ultrastructure of the Hyperthermophilic Archaeon *Pyrodictium abyssi*", Journal of structural biology 115, 78 - 87, (1995)

13. F. H. Schumann, H. Riepl, T. Maurer, W. Gronwald, K. P. Neidig, H. R. Kalbitzer, "Combined chemical shift changes and amino acid specific chemical shift mapping of protein-protein interactions" J. Biomol. NMR 39 (4): 275 - 289, (2007)

14. D. S. Wishart, C. G. Bigam, et al., "¹H, ¹³C and ¹⁵N chemical shift referencing in biomolecular NMR" J. Biomol. NMR 6 (2): 135 - 140, (1995)

15. P. Schanda, E. Kupce, et al., "SOFAST-HMQC experiments for recording two-dimensional heteronuclear correlation spectra of proteins within a few seconds." J. Biomol. NMR 33 (4): 199 - 211, (2005)

16. P. Schanda and B. Brutscher, "Very fast two-dimensional NMR spectroscopy for real-time investigation of dynamic events in proteins on the time scale of seconds." J. Am. Chem. Soc. 127 (22), 8014 - 8015, (2005)

17. J. G. Lees, et al., "A reference database for circular dichroism spectroscopy covering fold and secondary structure space" Bioinformatics, 22 (16): 1955 - 1962, (2006)

18. B. A. Wallace and L. Whitmore, "DICHROWEB, an online server for protein secondary structure analyses from circular dichroism spectroscopic data" *Nucleic Acids Research* 32 (2), 668 - 673, (2004)
19. N. Sreerama and R. W. Woody, "Estimation of protein secondary structure from circular dichroism spectra: comparison of CONTIN, SELCON, and CDSSTR methods with an expanded reference set", *Anal. Biochem.* 287 (2), 252 - 60, (2000)
20. L. A. Compton and W. C. Johnson Jr., "Analysis of protein circular dichroism spectra for secondary structure using a simple matrix multiplication" *Anal. Biochem.* 155 (1), 155 - 67, (1986)
21. P. Manavalan and W.C. Johnson Jr., "Variable selection method improves the prediction of protein secondary structure from circular dichroism spectra", *Anal. Biochem.* 167 (1), 76 - 85, (1987)
22. K. O. Stetter, G. Fiala, G. Huber, R. Huber and A. Segerer, "Hyperthermophilic Microorganisms", *FEMS Microbiology Reviews* 75, 117 - 124, (1990)
23. H. König, P. Messner and K. O. Stetter, "The fine structure of the fibers of *Pyrodictium occultum*", *FEMS Microbiology Letters* 49, 207 - 212, (1988)
24. K. O. Stetter, H. König, E. Stackebrandt, "*Pyrodictium* gen. nov., a new genus of submarine disc-shaped sulphur reducing archaebacteria growing optimally at 105 °C", *Systematic and Applied Microbiology* 4 (4), 535 - 551, (1983)
25. U. Pley, J. Schipka, A. Gambacorta, H. W. Jannasch, H. Fricke, K. O. Stetter, "*Pyrodictium abyssi* sp. nov. represents a novel heterotrophic marine archaeal hyperthermophile growing at 110 °C", *Systematic and Applied Microbiology* 14 (3), 245 - 253, (1991)
26. F. Lottspeich, J. W. Engels, "Bioanalytik", 2. Auflage, Spektrum Akademischer Verlag, (2006)

27. G. Rieger, "Elektronenmikroskopische und biochemische Untersuchungen zum Aufbau des Netzwerks bei *Pyrodictium*", Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, (1998)
28. C. Horn, "Lichtmikroskopische Untersuchungen zur Bildung und Funktion des Extrazellulären Netzwerkes von *Pyrodictium Abyssii*", Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, (1997)
29. S. Nickell, R. Hegerl, W. Baumeister and R. Rachel, "*Pyrodictium cannulae* enter the periplasmic space but do not enter the cytoplasm, as revealed by cryo-electron tomography", *Journal of Structural Biology* 141, 34 - 42, (2003)
30. B. Mai, "Genetische Charakterisierung und Expression der großen Thermosom-Untereinheiten aus *Pyrodictium occultum* in *E. coli* sowie molekularbiologische Untersuchungen zum extrazellulären Netzwerk von *Pyrodictium Abyssii* Isolat TAG11", Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, (1995)
31. H. R. Kalbitzer, R. Leberman and A. Wittinghofer, "¹H-NMR spectroscopy on elongation factor Tu from *Escherichia coli* - Resolution enhancement by perdeuteration", *FEBS Letters* 180, 40 - 42, (1985)
32. P. Ramm (Sander), "High Field ¹H-NMR Spectroscopy on Cell Suspensions of Neural Progenitor Cells and Brain Tumor-Initiating Cells", Dissertation am Lehrstuhl für Biologie und Vorklinische Medizin der Universität Regensburg, (2011)
33. M. R. Arnold, W. Kremer, H. D. Lüdemann, H. R. Kalbitzer, "¹H-NMR parameters of common amino acid residues measured in aqueous solutions of the linear tetrapeptides Gly-Gly-X-Ala at pressures between 0.1 and 200 MPa", *Biophysical Chemistry* 96, 129 - 140, (2002)
34. H. P. Erickson, "Size and Shape of Protein Molecules at the Nanometer Level Determined by Sedimentation, Gel Filtration, and Electron Microscopy" *Biol. Proced. Online* 11, 32 - 51, (2009)

35. C. S. Johnson Jr., "Diffusion ordered nuclear magnetic resonance spectroscopy: principles and applications", Prog. NMR Spectrosc. 34, 203 - 256, (1999)
36. D. H. Wilkins, S.B. Grimshaw, V. Receveur, C.M. Dobson, J.A. Jones and L.J. Smith, "Hydrodynamic radii of native and denatured proteins measured by pulse field gradient NMR techniques", Biochem. 38, 16424 - 16431, (1999)
37. V. A. Bloomfield, "Biological Applications in Dynamic Light Scattering – applications of Photon Correlation Spectroscopy", Ed.R.Pecora, Plenum Press New York & London, (1985)
38. C. N. Pace, et al., "How to measure and predict the molar absorption coefficient of a protein", Protein Sci. 4 (11), 2411 - 23, (1995)
39. S. C. Gill and P.H. von Hippel, "Calculation of protein extinction coefficients from amino acid sequence data", Anal. Biochem. 182 (2), 319 - 26, (1989)
40. U. K. Laemmli, "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4", Nature 227 (5259), 680 - 685, (1970)
41. www.expasy.org/protparam/
42. E. Gasteiger, C. Hoogland, et al., "Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server", The Proteomics Protocols Handbook, Humana Press, 571 - 607, (2005)
43. B. Mai, "In Vitro Untersuchungen zum extrazellulären Netzwerk von *Pyrodictium abyssi* Tag11", Dissertation am Lehrstuhl für Mikrobiologie der Universität Regensburg, (1998)
44. C. E. Munte, G. Gäde, B. Domogalla, W. Kremer, R. Kellner, H. R. Kalbitzer, "C-mannosylation in the hypertrehalosaemic hormone from the stick insect *Carausius morosus*", FEBS J. 275(6), 1163 - 73, (2008)

45. A. G. Palmer III, J. Cavanagh, P. E. Wright and M. Rance, "Sensitivity improvement in proton-detected 2-dimensional heteronuclear correlation NMR spectroscopy", J. Magn. Reson. 93, 151 - 170, (1991)
46. L. E. Kay, P. Keifer and T. Saarinen, "Pure absorption gradient enhanced heteronuclear single quantum correlation spectroscopy with improved sensitivity", J. Am. Chem. Soc. 114, 10663 - 10665, (1992)
47. J. Schleucher, M. Schwendinger, M. Sattler, P. Schmidt, O. Schedletzky, S. J. Glaser, O. W. Sorensen and C. Griesinger, "A general enhancement scheme in heteronuclear multidimensional NMR employing pulsed field gradients", J. Biomol. NMR 4, 301 - 306, (1994)
48. G. Bodenhausen and D. J. Ruben, "Natural abundance nitrogen-15 NMR by enhanced heteronuclear spectroscopy", Chem. Phys. Lett. 69 (1), 185 - 189, (1980)
49. M. Piotto, V. Saudek and V. Sklenar, "Gradient-tailored excitation for single-quantum NMR spectroscopy of aqueous solutions", J. Biomol. NMR 2 (6), 661 - 665, (1992)
50. V. Sklenar, M. Piotto, R. Leppik and V. Saudek, "Gradient-Tailored Water Suppression for ^1H - ^{15}N HSQC Experiments Optimized to Retain Full Sensitivity", J. Magn. Reson. 102 (2), 241 - 245, (1993)
51. M. Liu, X. Mao, C. He, H. Huang, J. K. Nicholson and J. C. Lindon, "Improved WATERGATE Pulse Sequences for Solvent Suppression in NMR Spectroscopy", J. Magn. Reson. 132 (1), 125 - 129, (1998)
52. G. Wider, V. Doetsch, K. Wuethrich, " Self-compensating pulsed-field gradients for short recovery times", J. Magn. Reson. 108, 255 - 258, (1994)
53. J. E. Tanner, "Use of the Stimulated Echo in NMR Diffusion Studies", J. Chem. Phys. 52 (5), 2523, (1970)

54. S. J. Gibbs and C. S. Johnson, "A PFG NMR experiment for accurate diffusion and flow studies in the presence of eddy currents", *J. Magn. Reson.* 93 (2), 395 - 402, (1991)
55. A. Bax and D. G. Davis, "MLEV-17-based two-dimensional homonuclear magnetization transfer spectroscopy", *J. Magn. Reson.* 65 (2), 355 - 360, (1985)
56. A. L. Davis, J. Keeler, E. D. Laue and D. Moskau, "Experiments for recording pure-absorption heteronuclear correlation spectra using pulsed field gradients", *J. Magn. Reson.* 98 (1), 207 - 216, (1992)
57. S. Grzesiek and A. Bax, "Improved 3D triple-resonance NMR techniques applied to a 31 kDa protein", *J. Magn. Reson.* 96 (2), 432 - 440, (1992)
58. J. Schleucher, M. Sattler and C. Griesinger, "Coherence selection by gradients without signal attenuation: application to three-dimensional HNCO experiments", *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 32, 1489-1491, (1993)
59. L. E. Kay, G. Y. Xu and T. Yamazaki, "Enhanced-Sensitivity Triple-Resonance Spectroscopy with Minimal H₂O Saturation", *J. Magn. Reson.* 109 (1), 129 - 133, (1994)
60. L. E. Kay, M. Ikura, R. Tschudin and A. Bax, "Three-dimensional triple-resonance NMR spectroscopy of isotopically enriched proteins", *J. Magn. Reson.* 89 (3), 496 - 514, (1990)
61. B. T. Farmer II, R. A. Venters, L. D. Spicer, M. G. Wittekind and L. Müller, "A refocused and optimized HNCA: Increased sensitivity and resolution in large macromolecules", *J. Biomol. NMR* 2 (2), 195 - 202, (1992)
62. S. Grzesiek and A. Bax, "Amino acid type determination in the sequential assignment procedure of uniformly ¹³C/¹⁵N-enriched proteins", *J. Biomol. NMR* 3 (2), 185 - 204, (1993)

63. D. R. Muhandiram and L. E. Kay, "Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity", J. Magn. Reson. B 103 (3), 203 - 216, (1994)
64. S. Grzesiek and A. Bax, "Correlating backbone amide and sidechain resonances in larger proteins by multiple relayed triple resonance NMR", J. Am. Chem. Soc. 114, 6291 - 6293, (1992)
65. F. Loehr, R. Haensel, V.V. Rogov & V. Doetsch, "Improved pulse sequences for sequence specific assignment of aromatic proton resonances in proteins", J. Biomol. NMR 37 (3), 205 - 224, (2007)
66. T. Yamazaki, J.D. Forman-Kay & L.E. Kay, "Two-dimensional NMR experiments for correlating carbon-13.β. and proton.δ./ε. chemical shifts of aromatic residues in 13C-labeled proteins via scalar couplings", J. Am. Chem. Soc. 115 (23), 11054 - 11055, (1993)
67. S. Grzesiek and A. Bax, "An efficient experiment for sequential backbone assignment of medium-sized isotopically enriched proteins", J. Magn. Reson. 99 (1), 201 - 207, (1992)
68. A. Bax, G. M. Clore and A. M. Gronenborn, "¹H-¹H correlation via isotropic mixing of ¹³C magnetization, a new three-dimensional approach for assigning ¹H and ¹³C spectra of ¹³C-enriched proteins", J. Magn. Reson. 88 (2), 425-431, (1990)
69. E. T. Olejniczak, R. X. Xu and S. W. Fesik, "A 4D HCCH-TOCSY experiment for assigning the side chain ¹H and ¹³C resonances of proteins", J. Biomol. NMR 2 (6) 655 - 659, (1992)
70. L. E. Kay, G. Y. Xu, A. U. Singer, D. R. Muhandiram and J. D. Forman-Kay, "A Gradient-Enhanced HCCH-TOCSY Experiment for Recording Side-Chain ¹H and ¹³C Correlations in H₂O Samples of Proteins", J. Magn. Reson. B 101 (3), 333 - 337, (1993)

71. V. Kanelis, L. Donaldson, D.R. Muhandiram, D. Rotin, J.D. Foreman-Kay & L.E. Kay, "Sequential assignment of proline-rich regions in proteins: Application to modular binding domain complexes", *J. Biomol. NMR* 16 (3), 253 - 259, (2000)
72. A. C. Wang, S. Grzesiek, R. Tschudin, P. J. Lodi and A. Bax, "Sequential backbone assignment of isotopically enriched proteins in D₂O by deuterium-decoupled HA(CA)N and HA(CACO)N", *J. Biomol. NMR* 5 (4), 376 - 382, (1995)
73. A. Elliott, E. J. Ambrose, "Structure of synthetic polypeptides", *Nature* 165, 921 - 922, (1950)
74. S. Krimm, J. Bandekar, "Vibrational spectroscopy and conformation of peptides, polypeptides, and proteins", *Adv. Protein Chem.* 38, 181 - 364, (1986)
75. J. Banker, "Amide modes and protein conformation", *Biochimica Biophysica Acta* 1120, 123 - 143, (1992)
76. T. Miyazawa, T. Shimanouchi, S. Mizushima, "Characteristic infrared bands of monosubstituted amides", *J. Chem. Phys.* 24, 408, (1956)
77. J. KONG and Y. U. Shaoning, "Fourier Transform Infrared Spectroscopic Analysis of Protein Secondary Structures", *Acta Biochimica Biophysica Sinica* 39 (8), 549 - 559, (2007)
78. H. Susi, D. M. Byler, "Resolution-enhanced fourier transform infrared spectroscopy of enzymes", *Methods Enzymol* 130, 290 - 311, (1986)
79. D. M. Byler, H. Susi, "Examination of the secondary structure of proteins by deconvolved FTIR spectra", *Biopolymer* 25, 469 - 487, (1986)
80. A. Dong, P. Huang, W. S. Caughey, "Redox-dependent changes in β -extended chain and turn structures of cytochrome c in water solution determined by second derivative amide I infrared spectra", *Biochemistry* 31, 182 - 189, (1992)

81. A. Dong, B. Caughey, W. S. Caughey, K. S. Bhat, J. E. Coe, "Secondary structure of the pentraxin female protein in water determined by infrared spectroscopy: Effects of calcium and phosphorylcholine", *Biochemistry* 31, 9364 – 9370, (1992)
82. Y. Shen, F. Delaglio, G. Cornilescu and A. Bax, "TALOS+: A hybrid method for predicting protein backbone torsion angles from NMR chemical shifts", *J. Biomol. NMR* 44 (4), 213 - 223, (2009)
83. M. V. Berjanskii and D. S. Wishart, "A simple method to predict protein flexibility using secondary chemical shifts", *J. Am. Chem. Soc.* 127, 14970 - 14971, (2005)
84. I. Z. Siemion, T. Wieland and K.-H. Pook, "Einfluß der Distanz des Prolincarbonyls vom β - und γ -Kohlenstoff auf die Lage der ^{13}C -NMR-Signale", *Angew. Chem.* 87 (19), 712 - 714, (1975)
85. M. Schubert, D. Labudde, H. Oschkinat and P. Schmieder, "A software tool for the prediction of Xaa-Pro peptide bond conformations in proteins based on ^{13}C chemical shift statistics", *J. Biomol. NMR* 24 (2), 149 – 154, (2002).
86. J. Körde, S. Forsén, T. Drakenberg and W. J. Chazin, "The Rate and Structural Consequences of Proline Cis-Trans Isomerization in Calbindin Dgk: NMR Studies of the Minor (cis-Pro43) Isoform and the Pro43Gly Mutant", *Biochemistry* 29, 4400 - 4409, (1990)
87. K. Wüthrich, M. Billeter and W. Braun, "Polypeptide Secondary Structure Determination by Nuclear Magnetic Resonance Observation of Short Proton-Proton Distances", *J. Mol. Biol.* 180, 715 - 740, (1984)
88. C. Wierschem, "Strukturelle und funktionelle Charakterisierung der Kalziumbindungsdomäne des Kalziumkanals TRPP1 mit Hilfe der hochauflösenden NMRSpektroskopie", Masterarbeit am Lehrstuhl für Biophysik und physikalische Biochemie der Universität Regensburg, (2013)

89. M. Gal, P. Schanda, B. Brutscher, and L. Frydman, "UltraSOFAST HMQC NMR and the Repetitive Acquisition of 2D Protein Spectra at Hz Rate" J. Am. Chem. Soc. 129 (5), 1372 - 1377, (2007)

90. http://de.wikipedia.org/wiki/Studentsche_t-Verteilung

9 Anhang

Die Daten sämtlicher chemischen Verschiebungen von K₁-CanA dürfen Aufgrund von Publikationsgründen noch nicht veröffentlicht werden. Für Anfragen bezüglich der chemischen Verschiebungen steht Herr Prof. Dr. Dr. Kalbitzer zur Verfügung.

Wasserstoffbrücken zwischen den β -Faltblättern:

die angegebenen Werte der Abstände sind Schätzwerte und entsprechen nicht den realen Werten

```
assign (resid 15 and name O ) (resid 37 and name HN ) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 15 and name O ) (resid 37 and name N ) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 37 and name O ) (resid 15 and name HN ) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 37 and name O ) (resid 15 and name N ) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 35 and name O ) (resid 17 and name HN ) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 35 and name O ) (resid 17 and name N ) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 17 and name O ) (resid 35 and name HN ) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 17 and name O ) (resid 35 and name N ) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 33 and name O ) (resid 19 and name HN ) 2.5 0.7 0.5
assign (resid 33 and name O ) (resid 19 and name N ) 3.5 0.7 0.5
assign (resid 31 and name O ) (resid 147 and name HN ) 2.5 0.7 0.5
assign (resid 31 and name O ) (resid 147 and name N ) 3.5 0.7 0.5
assign (resid 147 and name O ) (resid 31 and name HN ) 2.5 0.7 0.5
assign (resid 147 and name O ) (resid 31 and name N ) 3.5 0.7 0.5
assign (resid 34 and name O ) (resid 145 and name HN ) 2.5 0.7 0.5
assign (resid 34 and name O ) (resid 145 and name N ) 3.5 0.7 0.5
assign (resid 36 and name O ) (resid 143 and name HN ) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 36 and name O ) (resid 143 and name N ) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 143 and name O ) (resid 36 and name HN ) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 143 and name O ) (resid 36 and name N ) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 141 and name O ) (resid 38 and name HN ) 2.5 0.7 0.5
assign (resid 141 and name O ) (resid 38 and name N ) 3.5 0.7 0.5
assign (resid 148 and name O ) (resid 67 and name HN ) 2.5 0.7 0.5
```

assign (resid 148 and name O) (resid 67 and name N) 3.5 0.7 0.5
assign (resid 146 and name O) (resid 69 and name HN) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 146 and name O) (resid 69 and name N) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 69 and name O) (resid 146 and name HN) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 69 and name O) (resid 146 and name N) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 144 and name O) (resid 71 and name HN) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 144 and name O) (resid 71 and name N) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 71 and name O) (resid 144 and name HN) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 71 and name O) (resid 144 and name N) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 142 and name O) (resid 73 and name HN) 2.5 0.7 0.5
assign (resid 142 and name O) (resid 73 and name N) 3.5 0.7 0.5
assign (resid 91 and name O) (resid 68 and name HN) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 91 and name O) (resid 68 and name N) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 68 and name O) (resid 91 and name HN) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 68 and name O) (resid 91 and name N) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 89 and name O) (resid 70 and name HN) 2.5 0.7 0.5
assign (resid 89 and name O) (resid 70 and name N) 3.5 0.7 0.5
assign (resid 48 and name O) (resid 169 and name HN) 2.5 0.7 0.5
assign (resid 48 and name O) (resid 169 and name N) 3.5 0.7 0.5
assign (resid 167 and name O) (resid 50 and name HN) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 167 and name O) (resid 50 and name N) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 50 and name O) (resid 167 and name HN) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 50 and name O) (resid 167 and name N) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 52 and name O) (resid 165 and name HN) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 52 and name O) (resid 165 and name N) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 165 and name O) (resid 52 and name HN) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 165 and name O) (resid 52 and name N) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 47 and name O) (resid 102 and name HN) 2.5 0.7 0.5
assign (resid 47 and name O) (resid 102 and name N) 3.5 0.7 0.5
assign (resid 102 and name O) (resid 47 and name HN) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 102 and name O) (resid 47 and name N) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 100 and name O) (resid 49 and name HN) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 100 and name O) (resid 49 and name N) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 49 and name O) (resid 100 and name HN) 2.0 0.7 0.5

```

assign (resid 49 and name O ) (resid 100 and name N ) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 98 and name O ) (resid 51 and name HN ) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 98 and name O ) (resid 51 and name N ) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 51 and name O ) (resid 98 and name HN ) 2.0 0.7 0.5
assign (resid 51 and name O ) (resid 98 and name N ) 3.0 0.7 0.5
assign (resid 96 and name O ) (resid 53 and name HN ) 2.5 0.7 0.5
assign (resid 96 and name O ) (resid 53 and name N ) 3.5 0.7 0.5

```

bereits ermittelte NOE-Kontakte zwischen den β -Faltblättern:

die angegebenen Werte der Abstände sind Schätzwerte und entsprechen nicht den realen Werten

```

assign (resid 13 and name HB1 ) (resid 39 and name HE1 ) 4.6 0.9 1.5
assign (resid 13 and name HB2 ) (resid 39 and name HE1 ) 5.1 1.4 1.0
assign (resid 14 and name HA ) (resid 39 and name HE1 ) 5.0 1.0 1.0
assign (resid 15 and name HA ) (resid 39 and name HE1 ) 4.9 1.0 1.0
assign (resid 15 and name HB* ) (resid 39 and name HE1 ) 2.7 0.5 0.8
assign (resid 15 and name HG1 ) (resid 39 and name HE1 ) 3.7 0.7 2.5
assign (resid 15 and name HG2 ) (resid 39 and name HE1 ) 3.7 0.7 2.5
assign (resid 15 and name HN ) (resid 39 and name HE1 ) 4.2 0.8 0.8
assign (resid 37 and name HD1* ) (resid 39 and name HE1 ) 4.0 0.8 1.6
assign (resid 37 and name HG2* ) (resid 39 and name HE1 ) 3.6 0.7 1.4
assign (resid 37 and name HN ) (resid 39 and name HE1 ) 4.1 0.8 0.8
assign (resid 39 and name HE1 ) (resid 39 and name HB1 ) 4.4 0.9 1.1
assign (resid 39 and name HE1 ) (resid 39 and name HB2 ) 4.6 1.1 0.9
assign (resid 39 and name HE1 ) (resid 39 and name HD1 ) 2.5 0.5 0.5
assign (resid 39 and name HE1 ) (resid 39 and name HH2 ) 3.8 0.8 0.8
assign (resid 39 and name HE1 ) (resid 43 and name HB1 ) 3.8 0.8 2.6
assign (resid 39 and name HE1 ) (resid 43 and name HB2 ) 3.8 0.8 2.6
assign (resid 39 and name HE1 ) (resid 140 and name HG1* ) 5.6 1.1 3.6
assign (resid 39 and name HE1 ) (resid 140 and name HG2* ) 5.6 1.1 3.6
assign (resid 39 and name HE1 ) (resid 142 and name HG2* ) 6.1 1.2 2.4
assign (resid 75 and name HN ) (resid 123 and name HE1 ) 4.4 0.9 0.9

```

assign (resid 76 and name HN) (resid 123 and name HE1) 4.7 0.9 0.9
assign (resid 123 and name HE1) (resid 123 and name HB1) 4.3 0.9 1.6
assign (resid 123 and name HE1) (resid 123 and name HB2) 4.9 1.5 1.0
assign (resid 123 and name HE1) (resid 123 and name HD1) 2.6 0.5 0.5
assign (resid 123 and name HE1) (resid 123 and name HZ2) 2.8 0.6 0.6
assign (resid 123 and name HE1) (resid 126 and name HN) 3.7 0.7 0.7
assign (resid 123 and name HE1) (resid 127 and name HN) 3.8 0.8 0.8
assign (resid 123 and name HE1) (resid 128 and name HD1) 4.2 1.1 0.8
assign (resid 123 and name HE1) (resid 128 and name HD2) 3.9 0.8 1.1
assign (resid 123 and name HE1) (resid 132 and name HD1*) 3.3 0.7 1.3
assign (resid 123 and name HE1) (resid 132 and name HG11) 3.0 0.6 2.4
assign (resid 123 and name HE1) (resid 132 and name HG12) 3.0 0.6 2.4
assign (resid 13 and name HN) (resid 39 and name HN) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 15 and name HN) (resid 37 and name HN) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 17 and name HN) (resid 35 and name HN) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 38 and name HN) (resid 141 and name HN) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 36 and name HN) (resid 143 and name HN) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 34 and name HN) (resid 145 and name HN) 4.4 1.6 1.6
assign (resid 33 and name HN) (resid 147 and name HN) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 31 and name HN) (resid 147 and name HN) 4.4 1.6 1.6
assign (resid 73 and name HN) (resid 142 and name HN) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 71 and name HN) (resid 144 and name HN) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 69 and name HN) (resid 146 and name HN) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 67 and name HN) (resid 148 and name HN) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 89 and name HN) (resid 70 and name HN) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 91 and name HN) (resid 68 and name HN) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 93 and name HN) (resid 66 and name HN) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 48 and name HN) (resid 169 and name HN) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 50 and name HN) (resid 167 and name HN) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 52 and name HN) (resid 165 and name HN) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 54 and name HN) (resid 163 and name HN) 4.4 1.6 1.6
assign (resid 47 and name HN) (resid 102 and name HN) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 49 and name HN) (resid 100 and name HN) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 51 and name HN) (resid 98 and name HN) 3.4 1.6 1.6

assign (resid 12 and name HA) (resid 40 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 14 and name HA) (resid 38 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 16 and name HA) (resid 36 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 18 and name HA) (resid 34 and name HA*) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 39 and name HA) (resid 140 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 37 and name HA) (resid 142 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 35 and name HA) (resid 144 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 72 and name HA) (resid 143 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 70 and name HA) (resid 145 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 68 and name HA) (resid 147 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 66 and name HA) (resid 149 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 90 and name HA) (resid 140 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 92 and name HA) (resid 142 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 47 and name HA) (resid 170 and name HA) 4.4 1.6 1.6
assign (resid 49 and name HA) (resid 168 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 51 and name HA) (resid 166 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 53 and name HA) (resid 164 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 46 and name HA) (resid 103 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 48 and name HA) (resid 101 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 50 and name HA) (resid 99 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 52 and name HA) (resid 97 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 54 and name HA) (resid 95 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 13 and name HN) (resid 40 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 15 and name HN) (resid 38 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 17 and name HN) (resid 36 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 19 and name HN) (resid 34 and name HA*) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 39 and name HN) (resid 14 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 37 and name HN) (resid 16 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 35 and name HN) (resid 18 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 40 and name HN) (resid 140 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 38 and name HN) (resid 142 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 36 and name HN) (resid 144 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 34 and name HN) (resid 146 and name HA) 4.4 1.6 1.6
assign (resid 33 and name HN) (resid 146 and name HA) 3.4 1.6 1.6

assign (resid 31 and name HN) (resid 148 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 141 and name HN) (resid 39 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 143 and name HN) (resid 37 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 145 and name HN) (resid 35 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 147 and name HN) (resid 32 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 149 and name HN) (resid 31 and name HA) 4.4 1.6 1.6
assign (resid 73 and name HN) (resid 143 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 71 and name HN) (resid 145 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 69 and name HN) (resid 147 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 67 and name HN) (resid 149 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 144 and name HN) (resid 72 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 146 and name HN) (resid 70 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 148 and name HN) (resid 68 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 150 and name HN) (resid 66 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 89 and name HN) (resid 71 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 91 and name HN) (resid 69 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 93 and name HN) (resid 67 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 70 and name HN) (resid 90 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 68 and name HN) (resid 92 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 171 and name HN) (resid 47 and name HA) 4.4 1.6 1.6
assign (resid 169 and name HN) (resid 49 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 167 and name HN) (resid 51 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 165 and name HN) (resid 53 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 48 and name HN) (resid 170 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 50 and name HN) (resid 168 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 52 and name HN) (resid 166 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 54 and name HN) (resid 164 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 104 and name HN) (resid 46 and name HA) 3.9 1.6 1.6
assign (resid 102 and name HN) (resid 48 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 100 and name HN) (resid 50 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 98 and name HN) (resid 52 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 47 and name HN) (resid 103 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 49 and name HN) (resid 101 and name HA) 3.4 1.6 1.6
assign (resid 51 and name HN) (resid 99 and name HA) 3.4 1.6 1.6

assign (resid 53 and name HN) (resid 97 and name HA) 3.4 1.6 1.6

Torsionswinkel: TALOS+

assign (resid 11 and name C) (resid 12 and name N)
 (resid 12 and name CA) (resid 12 and name C) 1 -131.604 18.254 2
 assign (resid 12 and name N) (resid 12 and name CA)
 (resid 12 and name C) (resid 13 and name N) 1 146.604 20.119 2
 assign (resid 12 and name C) (resid 13 and name N)
 (resid 13 and name CA) (resid 13 and name C) 1 -130.559 20.026 2
 assign (resid 13 and name N) (resid 13 and name CA)
 (resid 13 and name C) (resid 14 and name N) 1 136.937 16.527 2
 assign (resid 13 and name C) (resid 14 and name N)
 (resid 14 and name CA) (resid 14 and name C) 1 -103.820 13.406 2
 assign (resid 14 and name N) (resid 14 and name CA)
 (resid 14 and name C) (resid 15 and name N) 1 122.573 9.310 2
 assign (resid 14 and name C) (resid 15 and name N)
 (resid 15 and name CA) (resid 15 and name C) 1 -119.064 11.718 2
 assign (resid 15 and name N) (resid 15 and name CA)
 (resid 15 and name C) (resid 16 and name N) 1 127.681 18.526 2
 assign (resid 15 and name C) (resid 16 and name N)
 (resid 16 and name CA) (resid 16 and name C) 1 -97.048 16.211 2
 assign (resid 16 and name N) (resid 16 and name CA)
 (resid 16 and name C) (resid 17 and name N) 1 127.834 10.827 2
 assign (resid 16 and name C) (resid 17 and name N)
 (resid 17 and name CA) (resid 17 and name C) 1 -98.388 19.005 2
 assign (resid 17 and name N) (resid 17 and name CA)
 (resid 17 and name C) (resid 18 and name N) 1 118.946 20.510 2
 assign (resid 19 and name C) (resid 20 and name N)
 (resid 20 and name CA) (resid 20 and name C) 1 -123.847 23.338 2
 assign (resid 20 and name N) (resid 20 and name CA)
 (resid 20 and name C) (resid 21 and name N) 1 149.249 11.845 2
 assign (resid 21 and name C) (resid 22 and name N)
 (resid 22 and name CA) (resid 22 and name C) 1 -93.967 14.518 2

```

assign (resid 22 and name N) (resid 22 and name CA)
  (resid 22 and name C) (resid 23 and name N) 1 132.525 23.274 2
assign (resid 22 and name C) (resid 23 and name N)
  (resid 23 and name CA) (resid 23 and name C) 1 -66.456 10.845 2
assign (resid 23 and name N) (resid 23 and name CA)
  (resid 23 and name C) (resid 24 and name N) 1 147.952 10.306 2
assign (resid 29 and name C) (resid 30 and name N)
  (resid 30 and name CA) (resid 30 and name C) 1 -122.246 25.220 2
assign (resid 30 and name N) (resid 30 and name CA)
  (resid 30 and name C) (resid 31 and name N) 1 144.672 13.246 2
assign (resid 30 and name C) (resid 31 and name N)
  (resid 31 and name CA) (resid 31 and name C) 1 -134.149 12.008 2
assign (resid 31 and name N) (resid 31 and name CA)
  (resid 31 and name C) (resid 32 and name N) 1 140.964 15.568 2
assign (resid 32 and name C) (resid 33 and name N)
  (resid 33 and name CA) (resid 33 and name C) 1 -89.450 11.061 2
assign (resid 33 and name N) (resid 33 and name CA)
  (resid 33 and name C) (resid 34 and name N) 1 2.513 12.251 2
assign (resid 33 and name C) (resid 34 and name N)
  (resid 34 and name CA) (resid 34 and name C) 1 68.588 13.151 2
assign (resid 34 and name N) (resid 34 and name CA)
  (resid 34 and name C) (resid 35 and name N) 1 36.032 14.891 2
assign (resid 34 and name C) (resid 35 and name N)
  (resid 35 and name CA) (resid 35 and name C) 1 -130.477 18.168 2
assign (resid 35 and name N) (resid 35 and name CA)
  (resid 35 and name C) (resid 36 and name N) 1 158.130 13.804 2
assign (resid 35 and name C) (resid 36 and name N)
  (resid 36 and name CA) (resid 36 and name C) 1 -126.652 17.939 2
assign (resid 36 and name N) (resid 36 and name CA)
  (resid 36 and name C) (resid 37 and name N) 1 135.533 17.598 2
assign (resid 36 and name C) (resid 37 and name N)
  (resid 37 and name CA) (resid 37 and name C) 1 -108.873 10.194 2
assign (resid 37 and name N) (resid 37 and name CA)
  (resid 37 and name C) (resid 38 and name N) 1 125.942 9.521 2

```


assign (resid 37 and name C) (resid 38 and name N)
 (resid 38 and name CA) (resid 38 and name C) 1 -109.484 11.312 2
assign (resid 38 and name N) (resid 38 and name CA)
 (resid 38 and name C) (resid 39 and name N) 1 124.957 11.331 2
assign (resid 38 and name C) (resid 39 and name N)
 (resid 39 and name CA) (resid 39 and name C) 1 -93.742 16.100 2
assign (resid 39 and name N) (resid 39 and name CA)
 (resid 39 and name C) (resid 40 and name N) 1 126.636 12.950 2
assign (resid 39 and name C) (resid 40 and name N)
 (resid 40 and name CA) (resid 40 and name C) 1 -95.123 17.901 2
assign (resid 40 and name N) (resid 40 and name CA)
 (resid 40 and name C) (resid 41 and name N) 1 115.486 22.346 2
assign (resid 40 and name C) (resid 41 and name N)
 (resid 41 and name CA) (resid 41 and name C) 1 -95.214 15.611 2
assign (resid 41 and name N) (resid 41 and name CA)
 (resid 41 and name C) (resid 42 and name N) 1 -26.453 16.847 2
assign (resid 42 and name C) (resid 43 and name N)
 (resid 43 and name CA) (resid 43 and name C) 1 -94.458 14.663 2
assign (resid 43 and name N) (resid 43 and name CA)
 (resid 43 and name C) (resid 44 and name N) 1 -13.702 22.639 2
assign (resid 43 and name C) (resid 44 and name N)
 (resid 44 and name CA) (resid 44 and name C) 1 -117.991 20.724 2
assign (resid 44 and name N) (resid 44 and name CA)
 (resid 44 and name C) (resid 45 and name N) 1 148.613 21.525 2
assign (resid 44 and name C) (resid 45 and name N)
 (resid 45 and name CA) (resid 45 and name C) 1 -91.076 12.155 2
assign (resid 45 and name N) (resid 45 and name CA)
 (resid 45 and name C) (resid 46 and name N) 1 -22.499 16.809 2
assign (resid 45 and name C) (resid 46 and name N)
 (resid 46 and name CA) (resid 46 and name C) 1 -139.725 27.386 2
assign (resid 46 and name N) (resid 46 and name CA)
 (resid 46 and name C) (resid 47 and name N) 1 150.751 18.996 2
assign (resid 46 and name C) (resid 47 and name N)
 (resid 47 and name CA) (resid 47 and name C) 1 -129.677 16.234 2

assign (resid 47 and name N) (resid 47 and name CA)
 (resid 47 and name C) (resid 48 and name N) 1 138.187 21.312 2
assign (resid 47 and name C) (resid 48 and name N)
 (resid 48 and name CA) (resid 48 and name C) 1 -107.591 12.006 2
assign (resid 48 and name N) (resid 48 and name CA)
 (resid 48 and name C) (resid 49 and name N) 1 127.370 10.052 2
assign (resid 48 and name C) (resid 49 and name N)
 (resid 49 and name CA) (resid 49 and name C) 1 -119.314 11.211 2
assign (resid 49 and name N) (resid 49 and name CA)
 (resid 49 and name C) (resid 50 and name N) 1 127.704 8.600 2
assign (resid 49 and name C) (resid 50 and name N)
 (resid 50 and name CA) (resid 50 and name C) 1 -121.461 11.640 2
assign (resid 50 and name N) (resid 50 and name CA)
 (resid 50 and name C) (resid 51 and name N) 1 123.908 6.502 2
assign (resid 50 and name C) (resid 51 and name N)
 (resid 51 and name CA) (resid 51 and name C) 1 -119.060 8.125 2
assign (resid 51 and name N) (resid 51 and name CA)
 (resid 51 and name C) (resid 52 and name N) 1 127.026 8.083 2
assign (resid 51 and name C) (resid 52 and name N)
 (resid 52 and name CA) (resid 52 and name C) 1 -119.234 22.218 2
assign (resid 52 and name N) (resid 52 and name CA)
 (resid 52 and name C) (resid 53 and name N) 1 133.356 15.084 2
assign (resid 52 and name C) (resid 53 and name N)
 (resid 53 and name CA) (resid 53 and name C) 1 -91.331 22.143 2
assign (resid 53 and name N) (resid 53 and name CA)
 (resid 53 and name C) (resid 54 and name N) 1 109.956 7.644 2
assign (resid 54 and name C) (resid 55 and name N)
 (resid 55 and name CA) (resid 55 and name C) 1 -77.758 20.247 2
assign (resid 55 and name N) (resid 55 and name CA)
 (resid 55 and name C) (resid 56 and name N) 1 -14.968 23.959 2
assign (resid 55 and name C) (resid 56 and name N)
 (resid 56 and name CA) (resid 56 and name C) 1 -58.056 10.130 2
assign (resid 56 and name N) (resid 56 and name CA)
 (resid 56 and name C) (resid 57 and name N) 1 -43.341 14.479 2

```

assign (resid 56 and name C) (resid 57 and name N)
  (resid 57 and name CA) (resid 57 and name C) 1 -57.399 5.896 2
assign (resid 57 and name N) (resid 57 and name CA)
  (resid 57 and name C) (resid 58 and name N) 1 -42.294 4.899 2
assign (resid 57 and name C) (resid 58 and name N)
  (resid 58 and name CA) (resid 58 and name C) 1 -66.923 8.921 2
assign (resid 58 and name N) (resid 58 and name CA)
  (resid 58 and name C) (resid 59 and name N) 1 -39.514 5.111 2
assign (resid 58 and name C) (resid 59 and name N)
  (resid 59 and name CA) (resid 59 and name C) 1 -88.041 16.365 2
assign (resid 59 and name N) (resid 59 and name CA)
  (resid 59 and name C) (resid 60 and name N) 1 -24.076 14.971 2
assign (resid 59 and name C) (resid 60 and name N)
  (resid 60 and name CA) (resid 60 and name C) 1 -53.765 9.649 2
assign (resid 60 and name N) (resid 60 and name CA)
  (resid 60 and name C) (resid 61 and name N) 1 -43.532 8.602 2
assign (resid 60 and name C) (resid 61 and name N)
  (resid 61 and name CA) (resid 61 and name C) 1 -60.849 7.103 2
assign (resid 61 and name N) (resid 61 and name CA)
  (resid 61 and name C) (resid 62 and name N) 1 -35.997 12.921 2
assign (resid 61 and name C) (resid 62 and name N)
  (resid 62 and name CA) (resid 62 and name C) 1 -90.685 15.141 2
assign (resid 62 and name N) (resid 62 and name CA)
  (resid 62 and name C) (resid 63 and name N) 1 -21.755 18.506 2
assign (resid 62 and name C) (resid 63 and name N)
  (resid 63 and name CA) (resid 63 and name C) 1 -109.983 32.852 2
assign (resid 63 and name N) (resid 63 and name CA)
  (resid 63 and name C) (resid 64 and name N) 1 150.484 17.218 2
assign (resid 63 and name C) (resid 64 and name N)
  (resid 64 and name CA) (resid 64 and name C) 1 -78.918 9.567 2
assign (resid 64 and name N) (resid 64 and name CA)
  (resid 64 and name C) (resid 65 and name N) 1 -26.808 11.012 2
assign (resid 64 and name C) (resid 65 and name N)
  (resid 65 and name CA) (resid 65 and name C) 1 -158.304 14.970 2

```

assign (resid 65 and name N) (resid 65 and name CA)
(resid 65 and name C) (resid 66 and name N) 1 150.754 12.412 2
assign (resid 65 and name C) (resid 66 and name N)
(resid 66 and name CA) (resid 66 and name C) 1 -121.087 24.344 2
assign (resid 66 and name N) (resid 66 and name CA)
(resid 66 and name C) (resid 67 and name N) 1 125.118 18.296 2
assign (resid 66 and name C) (resid 67 and name N)
(resid 67 and name CA) (resid 67 and name C) 1 -115.180 16.429 2
assign (resid 67 and name N) (resid 67 and name CA)
(resid 67 and name C) (resid 68 and name N) 1 133.564 11.741 2
assign (resid 67 and name C) (resid 68 and name N)
(resid 68 and name CA) (resid 68 and name C) 1 -115.440 11.460 2
assign (resid 68 and name N) (resid 68 and name CA)
(resid 68 and name C) (resid 69 and name N) 1 126.599 10.238 2
assign (resid 68 and name C) (resid 69 and name N)
(resid 69 and name CA) (resid 69 and name C) 1 -113.898 10.354 2
assign (resid 69 and name N) (resid 69 and name CA)
(resid 69 and name C) (resid 70 and name N) 1 127.828 12.559 2
assign (resid 69 and name C) (resid 70 and name N)
(resid 70 and name CA) (resid 70 and name C) 1 -114.576 7.734 2
assign (resid 70 and name N) (resid 70 and name CA)
(resid 70 and name C) (resid 71 and name N) 1 122.805 10.741 2
assign (resid 70 and name C) (resid 71 and name N)
(resid 71 and name CA) (resid 71 and name C) 1 -107.160 14.900 2
assign (resid 71 and name N) (resid 71 and name CA)
(resid 71 and name C) (resid 72 and name N) 1 121.810 7.652 2
assign (resid 71 and name C) (resid 72 and name N)
(resid 72 and name CA) (resid 72 and name C) 1 -128.130 14.228 2
assign (resid 72 and name N) (resid 72 and name CA)
(resid 72 and name C) (resid 73 and name N) 1 116.518 18.853 2
assign (resid 74 and name C) (resid 75 and name N)
(resid 75 and name CA) (resid 75 and name C) 1 -145.335 12.761 2
assign (resid 75 and name N) (resid 75 and name CA)
(resid 75 and name C) (resid 76 and name N) 1 157.619 12.986 2

assign (resid 75 and name C) (resid 76 and name N)
 (resid 76 and name CA) (resid 76 and name C) 1 -131.442 21.261 2
assign (resid 76 and name N) (resid 76 and name CA)
 (resid 76 and name C) (resid 77 and name N) 1 150.137 13.189 2
assign (resid 78 and name C) (resid 79 and name N)
 (resid 79 and name CA) (resid 79 and name C) 1 -64.513 14.613 2
assign (resid 79 and name N) (resid 79 and name CA)
 (resid 79 and name C) (resid 80 and name N) 1 -23.317 10.666 2
assign (resid 79 and name C) (resid 80 and name N)
 (resid 80 and name CA) (resid 80 and name C) 1 -72.290 4.296 2
assign (resid 80 and name N) (resid 80 and name CA)
 (resid 80 and name C) (resid 81 and name N) 1 -22.614 14.787 2
assign (resid 80 and name C) (resid 81 and name N)
 (resid 81 and name CA) (resid 81 and name C) 1 -94.547 19.610 2
assign (resid 81 and name N) (resid 81 and name CA)
 (resid 81 and name C) (resid 82 and name N) 1 -16.699 18.791 2
assign (resid 82 and name C) (resid 83 and name N)
 (resid 83 and name CA) (resid 83 and name C) 1 -95.092 13.010 2
assign (resid 83 and name N) (resid 83 and name CA)
 (resid 83 and name C) (resid 84 and name N) 1 -22.898 22.410 2
assign (resid 84 and name C) (resid 85 and name N)
 (resid 85 and name CA) (resid 85 and name C) 1 -117.438 14.846 2
assign (resid 85 and name N) (resid 85 and name CA)
 (resid 85 and name C) (resid 86 and name N) 1 131.227 12.188 2
assign (resid 85 and name C) (resid 86 and name N)
 (resid 86 and name CA) (resid 86 and name C) 1 -133.351 17.596 2
assign (resid 86 and name N) (resid 86 and name CA)
 (resid 86 and name C) (resid 87 and name N) 1 129.389 13.120 2
assign (resid 86 and name C) (resid 87 and name N)
 (resid 87 and name CA) (resid 87 and name C) 1 -71.040 11.181 2
assign (resid 87 and name N) (resid 87 and name CA)
 (resid 87 and name C) (resid 88 and name N) 1 130.139 4.833 2
assign (resid 87 and name C) (resid 88 and name N)
 (resid 88 and name CA) (resid 88 and name C) 1 -110.362 9.493 2

assign (resid 88 and name N) (resid 88 and name CA)
 (resid 88 and name C) (resid 89 and name N) 1 -31.221 10.267 2
assign (resid 88 and name C) (resid 89 and name N)
 (resid 89 and name CA) (resid 89 and name C) 1 -156.314 11.345 2
assign (resid 89 and name N) (resid 89 and name CA)
 (resid 89 and name C) (resid 90 and name N) 1 153.940 6.221 2
assign (resid 89 and name C) (resid 90 and name N)
 (resid 90 and name CA) (resid 90 and name C) 1 -126.297 17.721 2
assign (resid 90 and name N) (resid 90 and name CA)
 (resid 90 and name C) (resid 91 and name N) 1 134.407 12.621 2
assign (resid 90 and name C) (resid 91 and name N)
 (resid 91 and name CA) (resid 91 and name C) 1 -129.013 11.622 2
assign (resid 91 and name N) (resid 91 and name CA)
 (resid 91 and name C) (resid 92 and name N) 1 140.126 13.297 2
assign (resid 91 and name C) (resid 92 and name N)
 (resid 92 and name CA) (resid 92 and name C) 1 -110.588 17.666 2
assign (resid 92 and name N) (resid 92 and name CA)
 (resid 92 and name C) (resid 93 and name N) 1 172.259 12.535 2
assign (resid 92 and name C) (resid 93 and name N)
 (resid 93 and name CA) (resid 93 and name C) 1 -62.204 5.713 2
assign (resid 93 and name N) (resid 93 and name CA)
 (resid 93 and name C) (resid 94 and name N) 1 -28.889 10.172 2
assign (resid 93 and name C) (resid 94 and name N)
 (resid 94 and name CA) (resid 94 and name C) 1 -87.274 9.783 2
assign (resid 94 and name N) (resid 94 and name CA)
 (resid 94 and name C) (resid 95 and name N) 1 -7.795 19.587 2
assign (resid 94 and name C) (resid 95 and name N)
 (resid 95 and name CA) (resid 95 and name C) 1 -111.460 30.273 2
assign (resid 95 and name N) (resid 95 and name CA)
 (resid 95 and name C) (resid 96 and name N) 1 157.842 14.956 2
assign (resid 96 and name C) (resid 97 and name N)
 (resid 97 and name CA) (resid 97 and name C) 1 -145.458 19.515 2
assign (resid 97 and name N) (resid 97 and name CA)
 (resid 97 and name C) (resid 98 and name N) 1 156.838 9.967 2

assign (resid 97 and name C) (resid 98 and name N)
 (resid 98 and name CA) (resid 98 and name C) 1 -134.492 14.121 2
assign (resid 98 and name N) (resid 98 and name CA)
 (resid 98 and name C) (resid 99 and name N) 1 144.115 11.516 2
assign (resid 98 and name C) (resid 99 and name N)
 (resid 99 and name CA) (resid 99 and name C) 1 -110.473 15.059 2
assign (resid 99 and name N) (resid 99 and name CA)
 (resid 99 and name C) (resid 100 and name N) 1 119.446 8.457 2
assign (resid 99 and name C) (resid 100 and name N)
 (resid 100 and name CA) (resid 100 and name C) 1 -112.949 15.640 2
assign (resid 100 and name N) (resid 100 and name CA)
 (resid 100 and name C) (resid 101 and name N) 1 128.719 14.379 2
assign (resid 100 and name C) (resid 101 and name N)
 (resid 101 and name CA) (resid 101 and name C) 1 -116.533 9.957 2
assign (resid 101 and name N) (resid 101 and name CA)
 (resid 101 and name C) (resid 102 and name N) 1 130.397 13.083 2
assign (resid 101 and name C) (resid 102 and name N)
 (resid 102 and name CA) (resid 102 and name C) 1 -112.919 9.183 2
assign (resid 102 and name N) (resid 102 and name CA)
 (resid 102 and name C) (resid 103 and name N) 1 127.011 12.215 2
assign (resid 102 and name C) (resid 103 and name N)
 (resid 103 and name CA) (resid 103 and name C) 1 -96.187 19.596 2
assign (resid 103 and name N) (resid 103 and name CA)
 (resid 103 and name C) (resid 104 and name N) 1 168.481 14.284 2
assign (resid 103 and name C) (resid 104 and name N)
 (resid 104 and name CA) (resid 104 and name C) 1 -58.683 6.646 2
assign (resid 104 and name N) (resid 104 and name CA)
 (resid 104 and name C) (resid 105 and name N) 1 -35.604 11.514 2
assign (resid 104 and name C) (resid 105 and name N)
 (resid 105 and name CA) (resid 105 and name C) 1 -69.262 9.594 2
assign (resid 105 and name N) (resid 105 and name CA)
 (resid 105 and name C) (resid 106 and name N) 1 -35.931 7.399 2
assign (resid 105 and name C) (resid 106 and name N)
 (resid 106 and name CA) (resid 106 and name C) 1 -90.025 15.377 2

assign (resid 106 and name N) (resid 106 and name CA)
 (resid 106 and name C) (resid 107 and name N) 1 -29.629 20.626 2
assign (resid 107 and name C) (resid 108 and name N)
 (resid 108 and name CA) (resid 108 and name C) 1 -93.597 12.262 2
assign (resid 108 and name N) (resid 108 and name CA)
 (resid 108 and name C) (resid 109 and name N) 1 128.213 23.069 2
assign (resid 108 and name C) (resid 109 and name N)
 (resid 109 and name CA) (resid 109 and name C) 1 -129.020 19.288 2
assign (resid 109 and name N) (resid 109 and name CA)
 (resid 109 and name C) (resid 110 and name N) 1 143.799 21.221 2
assign (resid 109 and name C) (resid 110 and name N)
 (resid 110 and name CA) (resid 110 and name C) 1 -122.114 25.356 2
assign (resid 110 and name N) (resid 110 and name CA)
 (resid 110 and name C) (resid 111 and name N) 1 154.071 8.008 2
assign (resid 110 and name C) (resid 111 and name N)
 (resid 111 and name CA) (resid 111 and name C) 1 -100.743 26.335 2
assign (resid 111 and name N) (resid 111 and name CA)
 (resid 111 and name C) (resid 112 and name N) 1 163.820 14.690 2
assign (resid 114 and name C) (resid 115 and name N)
 (resid 115 and name CA) (resid 115 and name C) 1 -58.227 6.923 2
assign (resid 115 and name N) (resid 115 and name CA)
 (resid 115 and name C) (resid 116 and name N) 1 138.073 10.559 2
assign (resid 115 and name C) (resid 116 and name N)
 (resid 116 and name CA) (resid 116 and name C) 1 82.991 16.085 2
assign (resid 116 and name N) (resid 116 and name CA)
 (resid 116 and name C) (resid 117 and name N) 1 -1.457 21.269 2
assign (resid 116 and name C) (resid 117 and name N)
 (resid 117 and name CA) (resid 117 and name C) 1 -81.677 15.219 2
assign (resid 117 and name N) (resid 117 and name CA)
 (resid 117 and name C) (resid 118 and name N) 1 150.088 15.171 2
assign (resid 118 and name C) (resid 119 and name N)
 (resid 119 and name CA) (resid 119 and name C) 1 61.346 13.063 2
assign (resid 119 and name N) (resid 119 and name CA)
 (resid 119 and name C) (resid 120 and name N) 1 36.077 17.140 2

assign (resid 119 and name C) (resid 120 and name N)
 (resid 120 and name CA) (resid 120 and name C) 1 -120.571 31.931 2
assign (resid 120 and name N) (resid 120 and name CA)
 (resid 120 and name C) (resid 121 and name N) 1 163.067 13.069 2
assign (resid 120 and name C) (resid 121 and name N)
 (resid 121 and name CA) (resid 121 and name C) 1 -147.550 15.225 2
assign (resid 121 and name N) (resid 121 and name CA)
 (resid 121 and name C) (resid 122 and name N) 1 154.489 15.472 2
assign (resid 121 and name C) (resid 122 and name N)
 (resid 122 and name CA) (resid 122 and name C) 1 -126.915 13.397 2
assign (resid 122 and name N) (resid 122 and name CA)
 (resid 122 and name C) (resid 123 and name N) 1 133.584 16.340 2
assign (resid 122 and name C) (resid 123 and name N)
 (resid 123 and name CA) (resid 123 and name C) 1 -133.198 12.367 2
assign (resid 123 and name N) (resid 123 and name CA)
 (resid 123 and name C) (resid 124 and name N) 1 147.884 10.250 2
assign (resid 123 and name C) (resid 124 and name N)
 (resid 124 and name CA) (resid 124 and name C) 1 -107.856 30.407 2
assign (resid 124 and name N) (resid 124 and name CA)
 (resid 124 and name C) (resid 125 and name N) 1 143.680 15.213 2
assign (resid 127 and name C) (resid 128 and name N)
 (resid 128 and name CA) (resid 128 and name C) 1 -63.116 10.051 2
assign (resid 128 and name N) (resid 128 and name CA)
 (resid 128 and name C) (resid 129 and name N) 1 -21.153 6.536 2
assign (resid 130 and name C) (resid 131 and name N)
 (resid 131 and name CA) (resid 131 and name C) 1 -89.490 23.700 2
assign (resid 131 and name N) (resid 131 and name CA)
 (resid 131 and name C) (resid 132 and name N) 1 130.599 19.858 2
assign (resid 132 and name C) (resid 133 and name N)
 (resid 133 and name CA) (resid 133 and name C) 1 -148.103 12.778 2
assign (resid 133 and name N) (resid 133 and name CA)
 (resid 133 and name C) (resid 134 and name N) 1 143.269 10.621 2
assign (resid 133 and name C) (resid 134 and name N)
 (resid 134 and name CA) (resid 134 and name C) 1 -118.277 14.835 2

assign (resid 134 and name N) (resid 134 and name CA)
 (resid 134 and name C) (resid 135 and name N) 1 123.469 14.940 2
assign (resid 134 and name C) (resid 135 and name N)
 (resid 135 and name CA) (resid 135 and name C) 1 54.713 8.919 2
assign (resid 135 and name N) (resid 135 and name CA)
 (resid 135 and name C) (resid 136 and name N) 1 38.806 12.513 2
assign (resid 135 and name C) (resid 136 and name N)
 (resid 136 and name CA) (resid 136 and name C) 1 -145.339 17.047 2
assign (resid 136 and name N) (resid 136 and name CA)
 (resid 136 and name C) (resid 137 and name N) 1 145.673 11.679 2
assign (resid 136 and name C) (resid 137 and name N)
 (resid 137 and name CA) (resid 137 and name C) 1 -90.797 24.546 2
assign (resid 137 and name N) (resid 137 and name CA)
 (resid 137 and name C) (resid 138 and name N) 1 130.336 8.219 2
assign (resid 137 and name C) (resid 138 and name N)
 (resid 138 and name CA) (resid 138 and name C) 1 -97.209 27.943 2
assign (resid 138 and name N) (resid 138 and name CA)
 (resid 138 and name C) (resid 139 and name N) 1 119.392 14.990 2
assign (resid 138 and name C) (resid 139 and name N)
 (resid 139 and name CA) (resid 139 and name C) 1 -68.087 12.949 2
assign (resid 139 and name N) (resid 139 and name CA)
 (resid 139 and name C) (resid 140 and name N) 1 140.423 14.258 2
assign (resid 139 and name C) (resid 140 and name N)
 (resid 140 and name CA) (resid 140 and name C) 1 -144.117 27.957 2
assign (resid 140 and name N) (resid 140 and name CA)
 (resid 140 and name C) (resid 141 and name N) 1 159.863 13.432 2
assign (resid 140 and name C) (resid 141 and name N)
 (resid 141 and name CA) (resid 141 and name C) 1 -129.046 13.888 2
assign (resid 141 and name N) (resid 141 and name CA)
 (resid 141 and name C) (resid 142 and name N) 1 140.061 12.572 2
assign (resid 141 and name C) (resid 142 and name N)
 (resid 142 and name CA) (resid 142 and name C) 1 -119.754 15.580 2
assign (resid 142 and name N) (resid 142 and name CA)
 (resid 142 and name C) (resid 143 and name N) 1 123.649 10.481 2

assign (resid 142 and name C) (resid 143 and name N)
 (resid 143 and name CA) (resid 143 and name C) 1 -120.423 19.700 2
assign (resid 143 and name N) (resid 143 and name CA)
 (resid 143 and name C) (resid 144 and name N) 1 143.961 20.361 2
assign (resid 143 and name C) (resid 144 and name N)
 (resid 144 and name CA) (resid 144 and name C) 1 -115.112 24.942 2
assign (resid 144 and name N) (resid 144 and name CA)
 (resid 144 and name C) (resid 145 and name N) 1 136.710 13.411 2
assign (resid 144 and name C) (resid 145 and name N)
 (resid 145 and name CA) (resid 145 and name C) 1 -109.863 19.519 2
assign (resid 145 and name N) (resid 145 and name CA)
 (resid 145 and name C) (resid 146 and name N) 1 128.629 12.939 2
assign (resid 145 and name C) (resid 146 and name N)
 (resid 146 and name CA) (resid 146 and name C) 1 -118.883 26.854 2
assign (resid 146 and name N) (resid 146 and name CA)
 (resid 146 and name C) (resid 147 and name N) 1 130.268 13.501 2
assign (resid 146 and name C) (resid 147 and name N)
 (resid 147 and name CA) (resid 147 and name C) 1 -123.303 13.378 2
assign (resid 147 and name N) (resid 147 and name CA)
 (resid 147 and name C) (resid 148 and name N) 1 141.257 13.341 2
assign (resid 147 and name C) (resid 148 and name N)
 (resid 148 and name CA) (resid 148 and name C) 1 -116.437 13.323 2
assign (resid 148 and name N) (resid 148 and name CA)
 (resid 148 and name C) (resid 149 and name N) 1 130.952 16.548 2
assign (resid 148 and name C) (resid 149 and name N)
 (resid 149 and name CA) (resid 149 and name C) 1 -138.306 11.053 2
assign (resid 149 and name N) (resid 149 and name CA)
 (resid 149 and name C) (resid 150 and name N) 1 162.190 9.814 2
assign (resid 149 and name C) (resid 150 and name N)
 (resid 150 and name CA) (resid 150 and name C) 1 -134.555 24.842 2
assign (resid 150 and name N) (resid 150 and name CA)
 (resid 150 and name C) (resid 151 and name N) 1 132.143 9.395 2
assign (resid 150 and name C) (resid 151 and name N)
 (resid 151 and name CA) (resid 151 and name C) 1 -88.186 19.176 2

assign (resid 151 and name N) (resid 151 and name CA)
 (resid 151 and name C) (resid 152 and name N) 1 138.273 10.345 2
assign (resid 151 and name C) (resid 152 and name N)
 (resid 152 and name CA) (resid 152 and name C) 1 -101.229 30.526 2
assign (resid 152 and name N) (resid 152 and name CA)
 (resid 152 and name C) (resid 153 and name N) 1 141.534 16.698 2
assign (resid 152 and name C) (resid 153 and name N)
 (resid 153 and name CA) (resid 153 and name C) 1 -67.630 23.878 2
assign (resid 153 and name N) (resid 153 and name CA)
 (resid 153 and name C) (resid 154 and name N) 1 140.007 13.276 2
assign (resid 153 and name C) (resid 154 and name N)
 (resid 154 and name CA) (resid 154 and name C) 1 80.892 15.234 2
assign (resid 154 and name N) (resid 154 and name CA)
 (resid 154 and name C) (resid 155 and name N) 1 2.101 21.035 2
assign (resid 159 and name C) (resid 160 and name N)
 (resid 160 and name CA) (resid 160 and name C) 1 -121.404 21.472 2
assign (resid 160 and name N) (resid 160 and name CA)
 (resid 160 and name C) (resid 161 and name N) 1 161.017 23.435 2
assign (resid 162 and name C) (resid 163 and name N)
 (resid 163 and name CA) (resid 163 and name C) 1 -100.395 17.982 2
assign (resid 163 and name N) (resid 163 and name CA)
 (resid 163 and name C) (resid 164 and name N) 1 131.527 16.598 2
assign (resid 163 and name C) (resid 164 and name N)
 (resid 164 and name CA) (resid 164 and name C) 1 -118.043 18.657 2
assign (resid 164 and name N) (resid 164 and name CA)
 (resid 164 and name C) (resid 165 and name N) 1 138.838 17.551 2
assign (resid 164 and name C) (resid 165 and name N)
 (resid 165 and name CA) (resid 165 and name C) 1 -129.356 19.712 2
assign (resid 165 and name N) (resid 165 and name CA)
 (resid 165 and name C) (resid 166 and name N) 1 147.812 8.258 2
assign (resid 165 and name C) (resid 166 and name N)
 (resid 166 and name CA) (resid 166 and name C) 1 -123.897 20.103 2
assign (resid 166 and name N) (resid 166 and name CA)
 (resid 166 and name C) (resid 167 and name N) 1 135.539 15.832 2

assign (resid 166 and name C) (resid 167 and name N)
 (resid 167 and name CA) (resid 167 and name C) 1 -129.989 9.371 2
assign (resid 167 and name N) (resid 167 and name CA)
 (resid 167 and name C) (resid 168 and name N) 1 133.181 13.117 2
assign (resid 167 and name C) (resid 168 and name N)
 (resid 168 and name CA) (resid 168 and name C) 1 -79.642 12.002 2
assign (resid 168 and name N) (resid 168 and name CA)
 (resid 168 and name C) (resid 169 and name N) 1 121.733 10.426 2
assign (resid 168 and name C) (resid 169 and name N)
 (resid 169 and name CA) (resid 169 and name C) 1 -96.898 13.960 2
assign (resid 169 and name N) (resid 169 and name CA)
 (resid 169 and name C) (resid 170 and name N) 1 -32.885 10.086 2
assign (resid 169 and name C) (resid 170 and name N)
 (resid 170 and name CA) (resid 170 and name C) 1 -157.858 9.524 2
assign (resid 170 and name N) (resid 170 and name CA)
 (resid 170 and name C) (resid 171 and name N) 1 149.023 6.376 2
assign (resid 170 and name C) (resid 171 and name N)
 (resid 171 and name CA) (resid 171 and name C) 1 -123.506 20.558 2
assign (resid 171 and name N) (resid 171 and name CA)
 (resid 171 and name C) (resid 172 and name N) 1 129.269 17.195 2

10 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer für das interessante und herausfordernde Thema meiner Dissertation. Vielen Dank, für die zahlreichen Ideen, Gespräche und die Möglichkeit in einer harmonischen, interdisziplinären Arbeitsgruppe mit gut ausgestatteten Laboren und besten Spektrometern arbeiten zu dürfen.

Ich möchte mich ebenso bei all meinen Betreuern bedanken, die mir immer mit Rat und Tat zur Seite standen:

Bei Frau Dr. Gudrun Horn und Emmi Fuchs für die Einführung in das biochemische Arbeiten in einem S1-Labor, Herrn Prof. Dr. Dr. Hans Robert Kalbitzer und Herrn Prof. Dr. Werner Kremer für die Unterstützung bei NMR Fragen jeglicher Art und die Hilfestellung bei Messungen, bei Dr. Reto Bader für die ausführliche Betreuung und Geduld zu Beginn meiner Promotion und ganz besonders bei Frau Prof. Dr. Claudia Munte ohne deren Zuspruch und tatkräftige Hilfe ich niemals so weit gekommen wäre.

Bei Herrn Prof. em. Dr. Sumper, Herrn Prof. Dr. Rachel, Herrn Prof. Dr. Pfitzner, Herrn Prof. Dr. Deutzmann, Herrn Prof. Dr. Sterner und den entsprechenden Lehrstuhlmitarbeitern, möchte ich mich vielmals für die Zurverfügungstellung ihrer Analysegeräte und ihre Hilfsbereitschaft bedanken.

Mein Dank gehört den Auremolteammitgliedern Harald Donaubauer und Tobias Harsch, die wegen meines Themas unzählige zusätzliche Stunden programmieren mussten. Der arme Harry hat wegen mir bestimmt Unmengen an strukturell gebündelten weißen Haarbüscheln bekommen.

Herrn Dr. Paul Ramm möchte ich für die Unterstützung in sämtlichen NMR-Fragestellungen und die Stunden der Zerstreuung danken.

Bei meinen Kollegen Malte Andrasch und Johannes Hiltl möchte ich mich für die ganze Hilfe im Labor und die Herstellung des Konstrukts K₁-CanA bedanken, ohne das die strukturelle Zuordnung nicht funktioniert hätte.

Für die freundschaftliche Arbeitsatmosphäre, die unvergleichbare Hilfsbereitschaft, die tollen Gespräche und die vielen schönen Stunden die ich mit euch während meiner Zeit am Lehrstuhl verbringen durfte, möchte ich Maren, Tanja, Paul, Daniela, Harry, Claudia, Malte, Hannes, Tobi, Bärbel, Dörte, Sabine L., Sabine R., Simon, Sandra, Michael, Werner, Christoph, dem Tija, Robert, Groggy, Vroni, Jörg und Markus danken. Man findet selten so nette Arbeitskollegen und gute Freunde wie euch!

Meiner Mutter und meinem Bruder möchte ich für die Unterstützung und den Zusammenhalt in unserer Familie über all die Jahre danken. Meine Eltern haben es mir ermöglicht, meinen Weg zu gehen und ich verdanke ihnen viel. Meinem verstorbenen Vater, dem mein Dr. Titel sehr viel bedeutet hätte, möchte ich diese Arbeit widmen.

Der größte Dank gehört jedoch meiner Frau Sandra ohne deren Liebe, Zuspruch und Verständnis ich nicht durchgehalten hätte. Ich liebe Dich von ganzem Herzen und danke Dir für das größte Geschenk was ich jemals bekommen habe; unseren kleinen Sohn Julian.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig angefertigt und keine anderen als die angegebenen Quellen und Hilfsmittel benutzt habe.

Regensburg, Mai 2014

Raphael Kreitner